



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

**PREPARAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO DE
NANOPARTÍCULAS CONTENDO RESVERATROL E
AVALIAÇÃO DO EFEITO FOTOPROTETOR IN VITRO
FRENTE À PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA CAUSADA PELA
RADIAÇÃO SOLAR**

MAYAN CAVALCANTI SPACH

Florianópolis
Junho/2017

Mayan Cavalcanti Spach

**PREPARAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTICULAS
CONTENDO RESVERATROL E AVALIAÇÃO DO EFEITO
FOTOPROTETOR IN VITRO FRENTE À PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA
CAUSADA PELA RADIAÇÃO SOLAR**

Relatório apresentado ao Departamento de Química
da Universidade Federal de Santa Catarina,
como requisito parcial da disciplina de
Estágio Supervisionado II (QMC 5512)

Orientador: PROFa. Dra. ELENARA LEMOS SENNA
Coorientador: PROF. Dr. ALEXANDRE LUIS PARIZE

Florianópolis
Junho/2017

Mayan Cavalcanti Spach

**PREPARAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTICULAS
CONTENDO RESVERATROL E AVALIAÇÃO DO EFEITO
FOTOPROTETOR IN VITRO FRENTE À PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA
CAUSADA PELA RADIAÇÃO SOLAR**

Prof. Dr. Luciano Vitali
Coordenador de Estágio do Curso de Química-Bacharelado

Banca Examinadora:

Profa. Dra. ELENARA LEMOS SENNA
Orientador (assinada pelo orientador)

Prof. Alfredo T. Nunes Pires

Prof. Luís Otávio de B. Benetoli

Florianópolis
Junho/2017

Agradecimentos:

Inicialmente, gostaria de agradecer a minha orientadora Profa. Dra. Elenara Lemos Senna e ao coorientador Prof. Dr. Alexandre L. Parize por me aceitarem em suas equipes de trabalho, pelos conselhos, confiança e dedicação.

Meu muito obrigada ao Doutorando Andrés Felipe Chamorro, pelo apoio e disponibilidade.

Agradeço a equipe do laboratório de Farmacotécnica da UFSC, em especial a Marta, Carine e Mariana e também a equipe do Laboratório Polimat pelo auxílio e paciência.

Aos mais variados laboratórios da UFSC que me forneceram reagentes, equipamentos e ambiente de trabalho.

Meus agradecimentos aos professores que aceitaram ler e contribuir para este trabalho.

Aos professores da graduação de química, grandes mestres que me guiaram ao longo desta jornada. Pelos valiosos ensinamentos e atenção, mesmo fora de classe sempre dispostos a tirar dúvidas e compartilhar um pouquinho de suas experiências.

A minha querida família pelo suporte emocional, minha mãe Maria Alice e meus pais argentinos Eduardo e Graciela (muchas gracias).

Ao meu dedicado namorado, Guilherme Santos Pereira, pelo apoio incondicional, pelas aulas particulares de física e pelo seu amor e paciência. Aos meus queridos amigos e colegas de curso; Pedro, Caio, Eduardo, Massai, Luana, Leonardo, Alberto, Wanussa e em especial para a Alechania Misturini, pelas palavras de conforto, noites de estudo e amizade.

A todos aqueles que fizeram parte (direta ou indiretamente) desta longa caminhada, recebem aqui os meus sinceros agradecimentos.

Muito Obrigada!

SUMÁRIO

1.	Introdução.....	11
2.	Revisão da literatura.....	12
3.	Objetivos.....	27
3.1.	Objetivo Geral.....	27
3.2.	Objetivos específicos.....	27
4.	Materiais e métodos.....	27
4.1.	Materiais.....	27
4.1.1.	Matérias-primas e reagentes.....	27
4.2.	Equipamentos.....	27
4.3.	Procedimento experimental.....	28
4.3.1.	Preparação das nanocápsulas poliméricas.....	28
4.3.1.1.	Potencial zeta.....	28
4.3.1.2.	Morfologia.....	29
4.3.1.3.	Avaliação do teor e eficiência de encapsulação do resveratrol.....	29
4.3.1.4.	Avaliação da estabilidade das suspensões de nanocápsulas contendo resveratrol.....	29
4.3.1.5.	Avaliação da atividade fotoprotetora do resveratrol livre e nanoencapsulado em modelo de peroxidação lipídica.....	30
5.	Resultados e discussão.....	31
5.1.	Avaliação da estabilidade das suspensões de nanopartículas contendo resveratrol.....	31
5.2.	Potencial Zeta.....	38
5.3.	Morfologia.....	40
5.4.	Avaliação do teor e eficiência de encapsulação do resveratrol.....	43
5.5.	Avaliação da atividade fotoprotetora do resveratrol livre e nanoencapsulado em modelo de peroxidação lipídica.....	48

6.	Referências.....	56
----	------------------	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Formula estrutural da Avobenzona.	13
Figura 2 - A) Estrutura dos isômeros do resveratrol (esquerda trans e direita cis) e B) esqueleto dos estilbenos.	14
Figura 3 - Sequência de desprotonação dos hidrogênios ácidos no isômero trans do resveratrol.	15
Figura 4 - Estrutura geral dos fosfolipídios. Os grupamentos amina, fosfato e ésteres representam as regiões polares da molécula; a parte apolar é devida à presença das longas cadeias hidrocarbônicas (representadas por R).	17
Figura 5 - Esquema da fotocatalise lipídica que resulta em produtos carboxilados.	18
Figura 6 - Estrutura molecular do BHT. Devido à presença de grupos doadores nas posições orto e para, o hidrogênio fenólico se torna mais ácido, sendo mais facilmente abstraído da molécula.	19
Figura 7 - Reação de formação do cromóforo indicador.	20
Figura 8 - Esquema de polimerização da ϵ -caprolactona.	21
Figura 9 - Estrutura genérica do composto polisorbato 80, sendo a somatória de $w + x + y + z = 20$ carbonos.	23
Figura 10 - Esquema simplificado de um goniômetro de espalhamento de luz dinâmica.	25
Figura 11 - Representação esquemática do modelo da dupla camada elétrica para uma partícula com carga superficial negativa.	26
Figura 12 - Curvas da frequência de relaxação pelo quadrado do vetor de espalhamento apresentam no mínimo $r^2 = 0,979$	34
Figura 13 - Curva em função do logaritmo da distribuição do tempo de decaimento a 90°	35
Figura 14 - Distribuição do tempo de decaimento a 90°	35
Figura 15 - Gráfico da distribuição do raio hidrodinâmico da partícula a 90°	36

Figura 16 – Estudo dos raios hidrodinâmicos em função do tempo de armazenamento,	37
Figura 17 – Valores de PDI encontrados para cada suspensão em função do tempo de armazenamento,	38
Figura 18 - Micrografia das nanopartículas com RVTL encapsulado (NR).....	41
Figura 19 - micrografia das nanopartículas com AVO encapsulada (NA).	42
Figura 20 - micrografia das nanopartículas contendo AVO e RVTL encapsulados (NRA).	43
Figura 21 - Espectro de varredura obtido para o RVTL e AVO livres e para as nanocápsulas de PLC contendo as substâncias ativas em etanol.....	44
Figura 22 - Curva de calibração do RVTL em etanol.....	45
Figura 23 - Varredura espectral do aduto MDA:TBA.	48
Figura 24 - Reação de formação do MDA a partir da hidrólise ácida do TMP.....	48
Figura 25 - Curva de calibração do MDA em água a 530 nm.....	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - volumes e correspondentes concentração de TMP adicionados para cada ponto da curva de calibração.	31
Tabela 2 - Estudo comparativo entre o raio hidrodinâmico obtido pela varredura angular e pelo ângulo fixo de 90 °.	32
Tabela 3 - Valores de potencial zeta (PZ) obtidos a temperatura ambiente no tempo zero e após 60 dias de armazenamento.	39
Tabela 4 - Eficiência (EE) e teor de encapsulamento do ativo encontrados para estes sistemas nanoparticulados, realizados com as suspensões armazenadas por um período de 40 dias, ao abrigo de luz e temperatura de 4 °C.	47
Tabela 5 - Condições empregadas para o ensaio TBARS.....	50
Tabela 6 - Valores de MDA formado após exposição das amostras à radiação UVA.	51

LISTA DE ABREVIATURAS

AVO – Avobenzona (1-(4-(1,1-Dimetil-etil)fenil)-3-(4-metoxifenil)-1,3-propanodiona)

BHT - butil-hidróxitolueno, do inglês “butylated hydroxytoluene”

DLS – Espalhamento de luz dinâmico, do inglês “Dynamic Light Scattering”

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético, do inglês “Ethylenediamine tetraacetic acid”

EROs - Espécies oxigenadas reativas

FC - Fosfatidilcolina, do inglês “phosphatidylcholine”

MDA – Malondialdeído

PBS - Tampão fosfato-salino, do inglês “phosphate buffered saline”

PCL – Policaprolactona

PZ – Potencial Zeta

RVTL – trans-Resveratrol

TBA - Ácido 2-tiobarbitúrico, do inglês “thiobarbituric acid”

TBARS – do inglês “thiobarbituric acid reacting substances”, são as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico.

TCA - Ácido tricloroacético, do inglês “trichloroacetic acid”

TEM - Microscopia de transmissão eletrônica, do inglês “Transmission Electron Microscopy”

TMC - Triglicerídeos de cadeia média

TMP – 1,1,3,3-tetrametoxipropano

RESUMO

Foi feito o estudo da atividade fotoprotetora do resveratrol frente a peroxidação lipídica. Para tanto foram avaliados o seu potencial biológico na forma livre e nanoencapsulada. Para efeito comparativo, foram realizadas quatro suspensões de diferentes composições de partículas poliméricas de policaprolactona. Estas foram submetidas a estudos de raio hidrodinâmico, potencial zeta, pH, teor e eficiência de encapsulamento bem como o ensaio de fotoproteção frente a lipoperoxidação, com modelo de membrana fosfolipídica. Através do estudo da estabilidade em função do tempo, realizado via espalhamento de luz e potencial zeta, obtiveram-se tamanhos iniciais de 90 a 140 nm que após duas semanas de armazenamento encontraram-se na faixa de 60 a 100 nm para as diferentes formulações, mantendo-se próximos a esses valores ao longo dos 60 dias estudados. Os índices de polidispersão ficaram abaixo de 0,4 indicando baixa polidispersidade das suspensões coloidais, que apresentaram potências zeta negativos em torno de - 20 mV, cujo efeito eletrostático contribuiu para minimizar a chance de aglomeração além do efeito estérico proporcionado pelo surfactante não iônico utilizado. De forma geral os sistemas nanoencapsulados mostraram-se bons carreadores para o ativo, encontrando-se valores em torno de 80% para eficiência e teor de encapsulamento, demonstrando afinidade do polímero e do núcleo oleoso com o resveratrol. Determinou-se o pH ácido, em torno de 4 para os sistemas no tempo final de análise. Os resultados indicaram uma melhor atividade do resveratrol encapsulado frente a sua forma livre, que pode ser um indicio de necessária veiculação do ativo num sistema polimérico, uma vez que o resveratrol tem suas atividades comprometidas em decorrência de sua foto-instabilidade e sensibilidade ao pH do meio.

Palavras-chave: *Resveratrol, nanopartículas, lipoperoxidação, fotoproteção*

1. Introdução

Como as formulações de filtros solares não apresentam agentes químicos e físicos suficientes para oferecer uma proteção efetiva contra a exposição aos raios UVA-UVB, os produtos tidos como protetor solar evitam o desenvolvimento de queimaduras e o envelhecimento precoce da pele, mas a sua utilização não exclui a possibilidade de desenvolvimento do câncer de pele.

Visando uma real proteção contra este tipo de câncer, torna-se viável investir em formulações de filtros solares com agentes ativos que minimizem o estresse oxidativo, o processo de lipoperoxidação, a formação de radicais livres ou ainda que atuem na inibição das enzimas que propagam as inflamações cutâneas que promovem a proliferação de células tumorais.

Nesse contexto, destaca-se o resveratrol, composto que apresenta diversas atividades biológicas, dentre as quais evidencia-se o poder anti-inflamatório, antioxidante e quimiopreventivo. Contudo, devido ao resveratrol apresentar foto instabilidade, sensibilidade ao pH do meio e hidrofóbicidade o seu potencial biológico está limitado. Por isso, sistemas particulados que encapsulam e protegem o ativo são de grande interesse.

Assim sendo, o presente estudo teve como foco principal, obter nanopartículas de policaprolactona (PCL) contendo resveratrol encapsulado, objetivando a sua incorporação em uma formulação de um filtro solar. As nanopartículas obtidas foram caracterizadas quanto ao raio hidrodinâmico, potencial zeta e morfologia. Foram determinados pH, teor e eficiência de encapsulamento das suspensões obtidas que foram submetidas ao estudo de lipoperoxidação, estabelecendo a eficácia do resveratrol encapsulado frente à sua forma livre.

Buscando obter maiores indicativos do efeito benéfico do uso das nanopartículas de resveratrol em formulações fotoprotetoras, realizou-se o ensaio de peroxidação lipídica *in vitro*, na qual avalia a formação de malondialdeído formado na degradação lipídica após exposição à radiação, por meio da reação deste composto com ácido tiobarbitúrico, ensaio denominado TBARS. Para tal ensaio foi construída uma câmara de exposição utilizando uma lâmpada que emite radiação UVA, a qual é caracterizada por uma faixa de comprimento de onda com maior capacidade de

penetração através da pele, causando a formação de espécies radicalares que promovem, entre outras coisas, a degradação da membrana lipídica das células e a morte celular.

O presente trabalho buscou expandir as fronteiras do conhecimento a respeito da capacidade fotoprotetora do resveratrol livre a nanoencapsulado frente à peroxidação lipídica na busca de alternativas para a prevenção do câncer de pele.

2. Revisão da literatura

RADIAÇÃO SOLAR E PROTETOR SOLAR

Dentre os tipos de câncer, o melanoma ou câncer de pele é o mais recorrente nos seres humanos¹, sendo a radiação ultravioleta (UV) um importante fator associado ao desenvolvimento da doença². Com o intuito de reduzir a incidência do câncer de pele na população, o uso de formulações fotoprotetoras tem sido fortemente recomendado, visando prevenir o aparecimento de manchas, o envelhecimento precoce da pele e as queimaduras solares, que podem aumentar o risco de desenvolvimento deste tipo de câncer^{3,4}.

Conceitualmente, um protetor solar é constituído por uma mistura de compostos capazes de diminuir a quantidade de radiação ultravioleta que atinge a pele, por meio de absorção e/ou reflexão da radiação. A eficácia do protetor depende justamente da capacidade de absorção, que é proporcional a sua concentração, dos intervalos de absorção e do comprimento de onda (λ) máximo de absorção dos compostos presentes na formulação⁵. Para aumentar a eficácia dos filtros solares e proporcionar uma proteção de amplo espectro, geralmente é feita uma combinação de filtros UVA e UVB⁶.

Os raios UVB, embora apresentem menor poder de penetração na pele, são intensamente absorvidos pela epiderme, camada mais externa, sendo responsáveis pelo aparecimento de manchas, queimadura, inflamação, descamação e câncer. Os raios UVA, por sua vez, são menos energéticos e de 600 a 1000 vezes menos eritematógenos (causadores de vermelhidão e queimadura) que o UVB, em contrapartida possuem maior poder de penetração na pele atingindo as camadas mais profundas, como a derme⁴. De acordo com a (Equação 1:

$$E = \frac{hc}{\lambda} \quad (\text{Equação 1})$$

Em que E é a energia, h a constante de Plank, c a velocidade da luz no vácuo e λ o comprimento de onda em nanômetros, a radiação UVB (280 a 320 nm) é mais energética que a UVA (320 a 400 nm).

Essa radiação origina radicais livres e espécies reativas oxigenadas (EROs) que são responsáveis por processos oxidativos, levando a uma lesão indireta ao DNA, proteínas e membranas celulares, causando inúmeras patologias cutâneas, além do desenvolvimento de diferentes tipos de câncer^{1-7,8}.

Os filtros solares são compostos por agentes orgânicos e inorgânicos, que oferecem barreiras físicas ou químicas para a proteção contra a radiação solar. Os filtros orgânicos são moléculas que absorvem radiação eletromagnética em um ou mais comprimentos de onda específicos, transformando-a em outro tipo de energia menos nociva. Como filtros solares orgânicos têm-se compostos aromáticos com grupos carboxílicos e que apresentam um grupo doador de elétrons, ativador do anel, como o grupamento amina ou metoxila nas posições *orto* ou *para* do anel aromático. A **Figura 1** mostra a estrutura da 1-(4-(1,1-dimetiltil)fenil)-3-(4-metoxifenil)-1,3-propanodiona, como exemplo destes compostos, comercialmente conhecida como Parsol 1789 ou avobenzona (AVO), a qual é amplamente empregada na indústria cosmética como filtro químico.

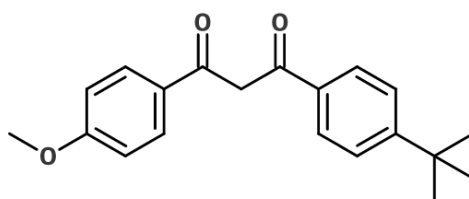


Figura 1 - Formula estrutural da Avobenzona.

Nessa molécula, os elétrons do π HOMO ao receberem energia eletromagnética, são excitados para o orbital π LUMO e ao retornarem para o seu estado inicial liberam a energia absorvida na forma de calor ou sofrem fotocatalise, promovendo a formação de outros compostos. A AVO é amplamente utilizada como filtro UVA, pois é nesta faixa de comprimentos de onda que o composto absorve mais intensamente, possuindo o seu máximo de absorção em aproximadamente

360 nm^{9,10,11}.

RESVERATROL

Considerando a prevenção dos processos foto-oxidativos que a pele sofre devido à exposição a fatores exógenos, principalmente à radiação UV, o uso tópico de antioxidantes representa uma estratégia interessante de proteção cutânea. Esse tipo de aplicação apresenta como benefícios o direcionamento da substância ativa à pele exposta, a promoção e o acúmulo desses componentes em concentrações efetivas e a formação de uma reserva suplementar, à medida que ocorre a exaustão dos sistemas antioxidantes já presentes na pele^{12,13}. Muitos estudos têm mostrado que produtos naturais, especialmente compostos polifenólicos, presentes em uma ampla variedade de frutas e legumes, podem atuar como agentes protetores contra os efeitos nocivos da radiação ultravioleta. Dentre os polifenólicos destaca-se o resveratrol (RVTL), pela nomenclatura IUPAC 5-[(E ou Z)-2-(hidroxifenil)etenil]benzeno-1,3-diol ou 3,4,5-trihidroxiestilbeno (**Figura 2**), pertencente à classe dos estilbenos, o RVTL é encontrado em nozes, amendoim e frutas vermelhas, como uva, amora, framboesa e outras^{1,9,11,14,15,16,17,18}.

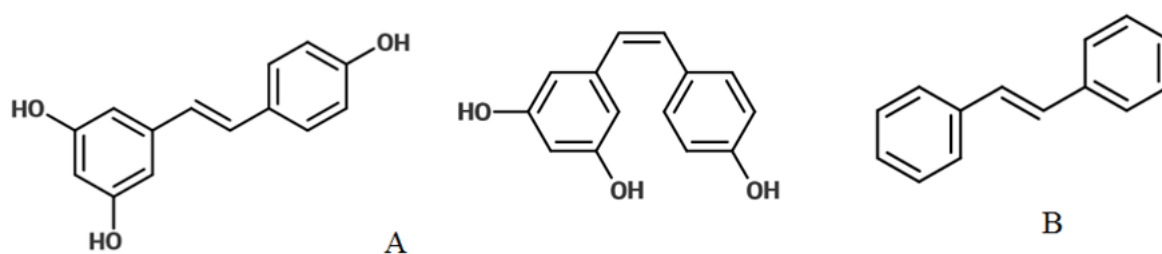


Figura 2 - A) Estrutura dos isômeros do resveratrol (esquerda trans e direita cis) e B) esqueleto dos estilbenos.

Comercialmente o resveratrol é encontrado na isomeria trans como um sólido branco, de fórmula molecular $C_{14}H_{12}O_3$ (massa molar = $228,24 \text{ g.mol}^{-1}$)¹⁹. Seu ponto de fusão é relatado na literatura na faixa de $253\text{-}255 \text{ }^{\circ}\text{C}$ e a sua estrutura molecular é formada por um eteno ligado a dois anéis aromáticos hidroxilados (com uma hidroxila no carbono 4 de um anel e nos carbonos 3 e 5 do outro) na conformação cis (Z) ou trans (E), conforme a **Figura 2**²⁰. Devido as ligações de carbono e hidrogênio e aos anéis benzílicos que lhe conferem uma boa distribuição da densidade eletrônica, a molécula apresenta maior caráter apolar, sendo praticamente insolúvel em meio

aquoso, com solubilidade de $0,03 \text{ mg.mL}^{-1}$ ($\sim 0,03 \text{ mM}$). Em etanol a sua solubilidade é 50 mg.mL^{-1} ($\sim 200 \text{ mM}$) e em dimetilsulfóxido (DMSO) é 16 mg.mL^{-1} ($\sim 70 \text{ mM}$), portanto, o RVTL é mais solúvel em solventes orgânicos^{21,22}. Na espectroscopia de absorção no UV-Vis o 3,4,5-Trihidroxiestilbeno exibe λ máximo em torno de 306 nm para o isômero trans e 286 nm para o cis^{14,19}. Normalmente a conformação cis é obtida pela irradiação da forma trans, que por ser mais estável ocorre em maior abundância, já o isômero cis é fotossensível e estável apenas em pH próximo a neutralidade¹⁵.

López-Nicolás *et al.*, empregaram técnicas de espectroscopia de UV-Vis e fluorescência²¹ para determinar os pK_{as} de desprotonação dos hidrogênios fenólicos do resveratrol, e obtiveram valores de $pK_{a1} = 8,8$ para a primeira desprotonação (composto B da figura 3), que ocorre predominantemente em pH 8,2 a 9,3; de $pK_{a2} = 9,8$ em pH 9,5 a 10,8 (composto C); e de $pK_{a3} = 11,4$ para a terceira desprotonação (composto D) em condições de pH entre 10,8 a 12,8 (**Figura 3**).

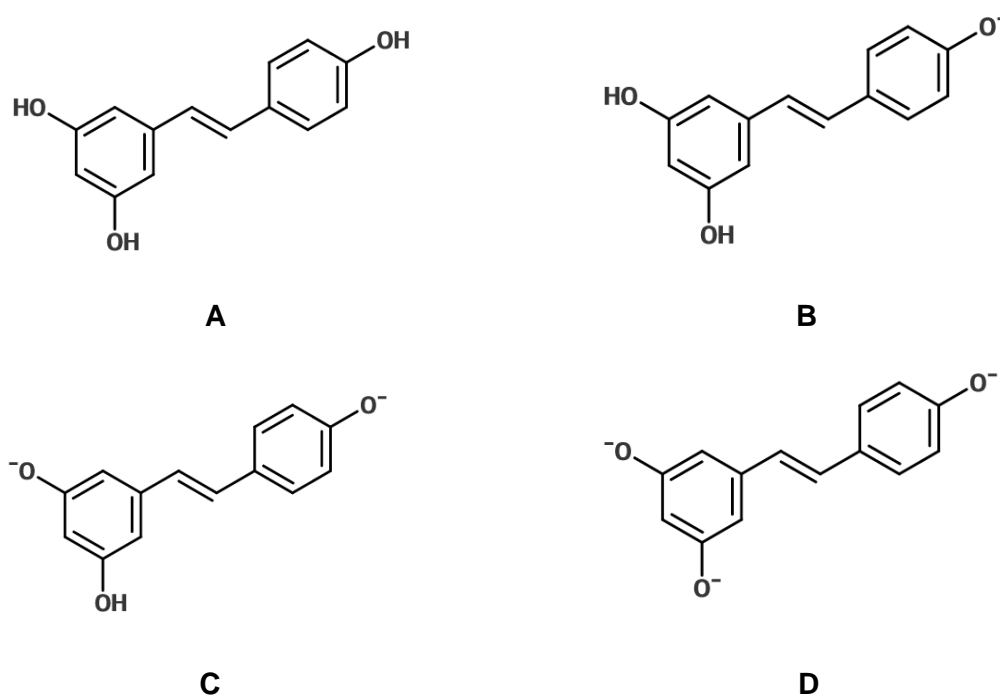


Figura 3 - Sequência de desprotonação dos hidrogênios ácidos no isômero trans do resveratrol.

Os autores ainda sugeriram que a perda dos prótons ocorre nessa ordem, devido a fatores de estabilização e redistribuição da carga negativa resultante. Quanto mais estável for o íon formado, mais fácil é a abstração do próton, e neste caso, além

da densidade eletrônica estar sob um elemento eletronegativo (oxigênio) ela pode ser ainda delocalizada através do anel e da dupla ligação, em um efeito de ressonância²⁰.

Naturalmente sintetizado por mais de 70 espécies de plantas, o resveratrol é caracterizado como fitoalexina, uma classe de moléculas de defesa, as quais são produzidas pelas plantas em resposta ao ataque de patógenos, como bactérias e fungos, exposição à luz ultravioleta, exposição ao ozônio, entre outros^{17,23}. Este composto apresenta inúmeras atividades biológicas, como anti-inflamatória, antioxidante, moduladora de algumas enzimas e do metabolismo dos lipídeos, antitumoral, antimutagênica, além de atuar na prevenção de doenças cardiovasculares^{1,22,24,25}. Um dos principais efeitos benéficos relatado em estudos com animais é a capacidade do RVTL de atuar em diferentes estágios do processo tumoral, definidos como iniciação, propagação e progressão^{16,24}, suprimindo a proliferação celular anômala e induzindo a apoptose das células tumorais²².

Segundo AFAQ *et al.*, a ação do resveratrol na proteção contra os danos causados pela penetração da energia eletromagnética na pele se deve principalmente por sua ação antioxidante e anti-inflamatória¹. Este composto apresenta a capacidade de inibir a formação de radicais livres, dificultando a formação das espécies reativas de oxigênio (EROs), geradas pelo estresse oxidativo das células^{22,24}. Exemplos de EROs são: o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), superóxido, radical peroxí, dentre outros¹⁶. A minimização das EROs se faz por meio do aumento da atividade das enzimas antioxidativas ou de seus substratos, como a superóxido dismutase, heme oxigenase-1, glutathione peroxidase-1, dentre outras^{16,26}. Atua também na inibição da peroxidase lipídica, cuja exposição aos raios UV provocam um aumento excessivo da ação desta enzima¹. FREMONT, L mostrou também que o RVTL tem grande efeito quelante, principalmente do Cu e Fe, sendo capaz de proteger as membranas lipídicas de sofrerem a lipoperoxidação induzida por metais²³.

LIPÍDIOS E LIPOPEROXIDAÇÃO

Os lipídios são moléculas passíveis de sofrer a ação de espécies reativas de oxigênio, radicais livres e algumas enzimas (como a lipooxigenase). Como exemplo, tem-se a fosfatidilcolina (FC), presente em fontes naturais, como na gema do ovo ou na soja. Este composto é constituído por uma mistura de fosfolipídios, os quais são

lipídios complexos formados por uma parte nitrogenada, uma fosforada e outra carboxilada dos ésteres. São compostos anfifílicos, possuindo uma parte hidrofílica e parte hidrofóbica. A estrutura molecular genérica dos fosfolipídios está representada na **Figura 4**²⁷.

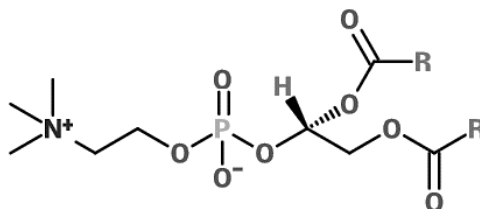


Figura 4 - Estrutura geral dos fosfolipídios. Os grupamentos amina, fosfato e ésteres representam as regiões polares da molécula; a parte apolar é devida à presença das longas cadeias hidrocarbônicas (representadas por R).

Graças a sua característica anfifílica, a FC é capaz de originar estruturas lamelares ou micelares, as quais são amplamente utilizadas como modelos de membrana fosfolipídica, análoga a membrana celular. As longas cadeias carbonadas acíclicas (de 16 a 22 carbonos) podem conter insaturações que a torna passível de sofrer degradação radicalar²⁶.

A peroxidação lipídica pode iniciar-se, dentre outras formas, por meio de formação de compostos radicalares ou pela ativação de um oxigênio, que passa do estado de energia do tripleto para o singleto; essa mudança de estado pode ser originada pela excitação energética, ou por redução do oxigênio via utilização de um catalizador (enzimático ou não)²⁸. Estes dois mecanismos são distintos mas apresentam semelhantes resultados de degradação da membrana lipídica. Uma vez iniciada a reação, ela se torna auto catalítica, pois os subprodutos radicalares dão continuidade a auto oxidação (**Figura 5**).

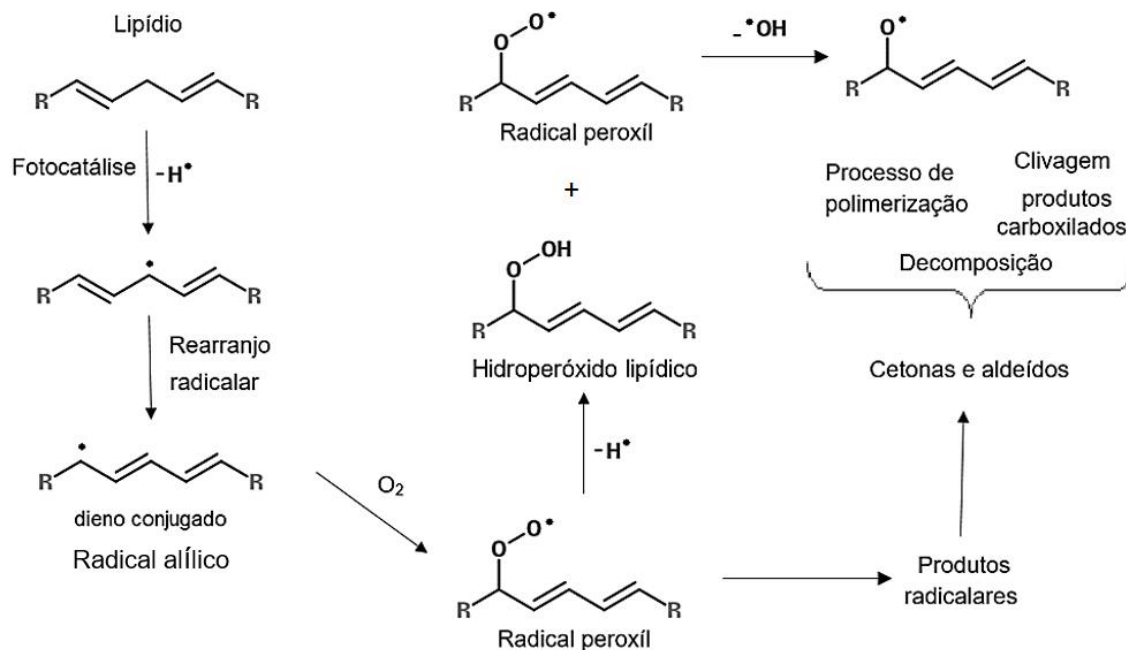


Figura 5 - Esquema da fotocatalise lipídica que resulta em produtos carboxilados.

A auto oxidação por via radicalar, é iniciada pela perda de um hidrogênio de um dos metilenos da dupla ligação do lipídio insaturado, formando um radical alílico estável, onde a nuvem eletrônica é delocalizada sob os três átomos de carbono.

Na propagação, o radical alílico reage com uma molécula de oxigênio para formar um radical peroxil. Este radical dá continuidade à reação, reagindo com outra cadeia lipídica poli-insaturada, formando um hidroperóxido lipídico e um novo radical peroxil. A etapa lenta que determina a velocidade da reação é da formação deste radical. A propagação está atrelada ao grau de instauração do lipídio, quanto mais insaturada a molécula, maior a velocidade da lipoperoxidação.

A etapa da terminação ocorre quando dois radicais reagem formando espécies não radicalares ou ainda na presença de hidrogênio ou de algum composto doador, sendo as cetonas e aldeídos os principais produtos da degradação dos lipídeos^{28,29}.

ANTIOXIDANTE BUTIL HIDROXITOLUENO

Um exemplo de composto doador de hidrogênio é o butil hidroxitolueno (BHT) (**Figura 6**), que é um antioxidante sintético amplamente empregado na indústria alimentícia. Atua inibindo a peroxidação lipídica por meio da doação de hidrogênio

para os radicais presentes, impedindo que a reação se propague pela abstração de prótons de moléculas lipídicas vizinhas^{30,28}.

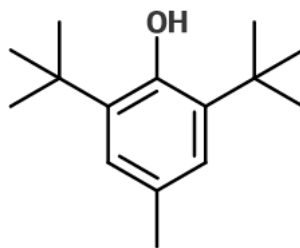


Figura 6 - Estrutura molecular do BHT. Devido à presença de grupos doadores nas posições orto e para, o hidrogênio fenólico se torna mais ácido, sendo mais facilmente abstraído da molécula.

PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA E ENSAIO TBARS

O processo de peroxidação lipídica é recorrente em plantas e animais e apresenta grande complexidade, pois envolve diversos fatores, sendo alguns deles a formação e propagação de radicais, rearranjo ou perda de oxigênios, quebra ou reorganização de ligações duplas e a formação de subprodutos da degradação da membrana celular³¹. Dessas reações podem-se formar hidroperóxido e outros radicais (como o peroxí, hidroxí ou alcóxí), que podem oxidar lipídeos ou serem convertidos em compostos carbonílicos, como principalmente o dialdeído malônico ou malondialdeído (MDA)³².

Uma forma de avaliar a extensão da peroxidação lipídica é através da quantificação do malondialdeído formado no processo. Uma técnica de quantificação da lipoperoxidação é realizada reagindo o MDA formado com o ácido 2-tiobarbitúrico (TBA), conhecido como o ensaio de substâncias reativas ao TBA, ou método TBARS. Entretanto, o MDA é um composto volátil que pode sofrer auto condensação aldólica, desencadeando um processo de polimerização, originando compostos que não reagem com o ácido 2-tiobarbitúrico (TBA). Para garantir a integridade do método TBARS, o MDA não é diretamente empregado para construção da curva de calibração padrão e para isso, faz-se uma hidrólise ácida do 1,1,3,3-tetrametoxipropano (TMP) ou do 1,1,3,3-tetraetoxipropano (reagentes padrões), formando o dialdeído malônico, que em meio ácido, reage com o ácido 2-tiobarbitúrico produzindo o aduto MDA:TBA 1:2, como indicado na reação da **Figura 7**³³.

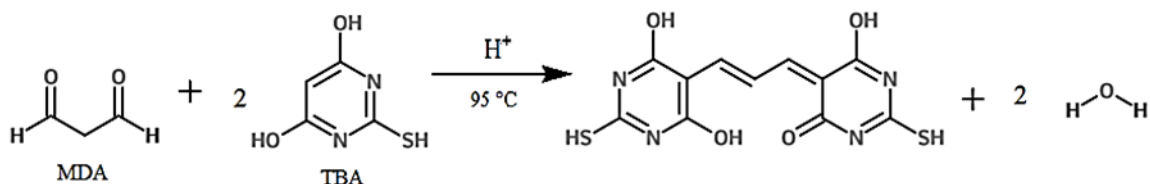


Figura 7 - Reação de formação do cromóforo indicador.

A formação da espécie rósea-avermelhada MDA:TBA que absorve na região do visível, em aproximadamente 535 nm, permite a determinação e quantificação da peroxidase lipídica por espectrofotometria de absorção no VIS³⁴.

Além desse ensaio, outras metodologias podem ser utilizadas para identificar a ocorrência da lipoperoxidação, como o ensaio de iodometria, de dieno conjugado entre outras²⁸. Esses estudos também permitem a análise da inibição do processo de degradação da membrana lipídica na presença de compostos antioxidantes, no qual o RVTL já apresenta comprovada eficiência segundo TADOLINI *et al.*,³⁵.

NANOPARTÍCULAS

Contudo, as inúmeras aplicações do RVTL estão limitadas à algumas propriedades físico-químicas do composto, como a instabilidade frente à luz e em pH básico, acima de 9²⁰. Essas características tornam este composto suscetível à degradação, podendo comprometer as suas atividades biológicas³². Além disso, o resveratrol exibe baixa solubilidade aquosa, tornando necessária a veiculação deste composto em formulações que o permitam alcançar o sítio alvo de sua ação biológica.

Neste contexto, nas últimas décadas, a nanoencapsulação tem sido usada como estratégia promissora para a melhoria das propriedades físico-químicas e da atividade biológica de compostos ativos, visto que tais sistemas permitem a proteção frente à degradação em condições ambientais e fisiológicas, e a liberação controlada do ativo no sítio em que deve ocorrer a sua absorção ou sua ação^{36,37}. Normalmente, a liberação de um fármaco se faz através da difusão, degradação ou abertura das nanopartículas frente a um estímulo externo que pode ser uma mudança de pH, temperatura, energia eletromagnética – na forma de radiação, dentre outros³³. Na área cosmética, a nanotecnologia vem sendo utilizada há vários anos e tem proporcionado sistemas capazes de liberar compostos ativos na pele. Dentre estes sistemas destacam-se as nanopartículas que desempenham importantes funções, seja

promovendo a permeação cutânea de compostos encapsulados ao fornecer um contato íntimo com o estrato córneo, produzindo efeito oclusivo e/ou proporcionando o aumento da permeabilidade cutânea além de apresentar significativa diminuição na dose administrada, diminuindo com isso os efeitos colaterais, os níveis de toxicidade e aumentando, de forma geral a sua eficiência^{34,38,39,40}.

O crescente interesse no emprego das nanopartículas deve-se também a possibilidade de controle de parâmetros específicos, tais como características físico-químicas, magnetismo, tamanho, morfologia, dentre outros aspectos. A morfologia das nanopartículas está diretamente associado à concentração na qual se encontram, à temperatura, ao método de obtenção das estruturas e também às propriedades físico-químicas de cada polímero^{32,34}.

POLICAPROLACTONA

Ao longo do desenvolvimento da nanoencapsulação, diversos polímeros naturais ou sintéticos foram testados quanto as suas propriedades físico-químicas e inércia frente aos ativos encapsulados. Neste contexto se encontra a policaprolactona (PCL) (**Figura 8**), um poliéster alifático hidrofóbico biodegradável e biocompatível, ou seja, capaz de ser degradado por hidrólise química ou enzimática das ligações ésteres, gerando compostos não tóxicos que são assimilados pelo organismo⁴¹.

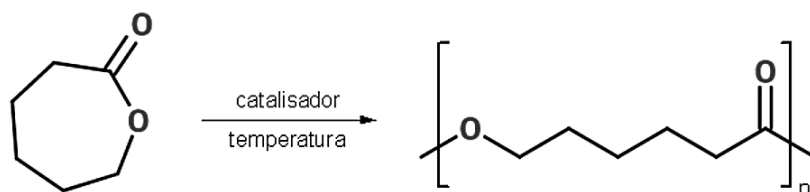


Figura 8 - Esquema de polimerização da ϵ -caprolactona.

Porém em comparação com outros polímeros de mesma classe, tais como o ácido polilático (PLA) ou o poli (ácido lático-co-ácido glicólico) (PLGA), apresenta, vantajosamente, degradação mais lenta, possuindo maior resistência à hidrólise química, biocompatibilidade e grande compatibilidade com agentes ativos, possibilitando o nanoencapsulamento dos mesmos^{42,43}. Essas características proporcionam maior tempo de disponibilidade do ativo no organismo, como indicado

por Rosado et al., que prepararam nanopartículas de PCL contendo um hidrocortisona encapsulado para tratamento de dermatite ⁴⁴.

Nanopartículas poliméricas são carreadores que, conforme a sua estrutura, composição e método de preparo, podem ser classificadas em nanocápsulas ou nanoesferas⁴⁵. As nanocápsulas são sistemas vesiculares em que a substância ativa é confinada em uma cavidade preenchida com um núcleo oleoso, e revestida por uma parede polimérica, enquanto as nanoesferas são sistemas em que a substância se encontra fisicamente e uniformemente dispersa em uma matriz^{46,47}. Dentre os nanocarreadores poliméricos, as nanocápsulas mostram-se mais promissoras por apresentarem uma série de vantagens. Além do seu tamanho nanométrico, que permite uma maior captura intracelular das substâncias encapsuladas, e de sua capacidade de promover a penetração de compostos ativos até as camadas mais profundas da pele, as nanocápsulas também são capazes de proteger a substância ativa frente à oxidação, transportar substâncias insolúveis em água com altos níveis de eficiência de encapsulação, e controlar a liberação⁴⁸.

NANOPRECIPITAÇÃO

O mecanismo de formação das nanocápsulas com resveratrol encapsulado pode ser explicado em termos da turbulência interfacial que é espontaneamente gerada pela mistura de duas fases orgânica e aquosa, mutuamente miscíveis entre si. A rápida difusão da acetona em água promove a formação das nanogotas de óleo que servem como núcleo para o polímero hidrofóbico, que por sua vez migra para a interface o/a. Neste caso, é necessária a presença de um composto anfifílico para minimizar a tensão interfacial e impedir a coalescência das gotas de óleo. Como o polímero tem a sua solubilidade reduzida com a mistura dos solventes, ele precipita na interface, encapsulando as gotículas de óleo e resultando na suspensão leitosa. Após estabilizado o sistema, o solvente orgânico é removido sob pressão reduzida e aquecimento brando. E a suspensão é concentrada em consequência da evaporação da água⁴⁹.

O óleo utilizado para formação do núcleo das nanopartículas é geralmente uma mistura de triglicerídeos, que vão de acordo com as exigências de cada processo. No caso de nanoencapsulamento de fármacos, é amplamente empregada a mistura de triglicerídeos de ácido cáprico e caprílico (TCM), devido ao fato desses compostos

apresentarem baixa viscosidade, pois derivam de ácidos graxos altamente saturados. Em virtude do tamanho médio das cadeias, estes triglicerídeos apresentam solubilidade em álcoois, são resistentes a processos oxidativos, atóxicos, e bons solventes para filtros solares, como a avobenzona, dentre outras propriedades⁵⁰. A baixa viscosidade confere aos TCM estado líquido na temperatura ambiente, fator crucial para facilitar uma melhor incorporação do fármaco lipossolúvel no sistema.

Como as partículas pouco ou nada solúveis no meio devem manter-se em suspensão, é necessário promover a estabilização das estruturas poliméricas com o emprego de alguma substância tensoativa, ou seja, um surfactante que diminua a tensão interfacial possibilitando que as fases se mantenham em equilíbrio, evitando a coalescência e separação das mesmas. Conceitualmente, os surfactantes são moléculas anfifílicas, capazes de diminuir a energia do sistema ao interagir com ambas as fases da interface. A **Figura 9** ilustra um exemplo de surfactante vastamente utilizado na indústria, o monooleato de sorbitano etoxilado ou polisorbato 80, comercialmente conhecido como Tween 80³⁷.

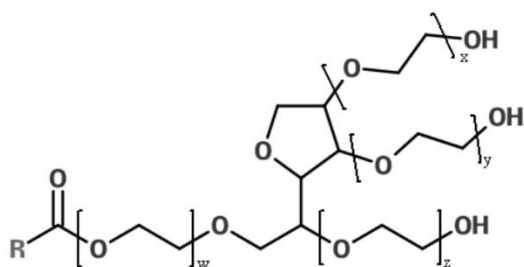


Figura 9 - Estrutura genérica do composto polisorbato 80, sendo a somatória de $w + x + y + z = 20$ carbonos.

De acordo com Fayad *et al.*, este sorbitol polietoxilado ainda agrega um maior efeito de estabilização, devido as suas longas cadeias hidrofóbicas, que quando adsorvidos na interface das partículas poliméricas contribuem para aumentar o efeito estérico entre elas⁵¹.

Após preparado um sistema polimérico, é de suma importância conhecer suas características como tamanho, morfologia e carga das partículas, pois estas influenciam diretamente na aplicabilidade e estabilidade do sistema. O tamanho das nanoestruturas é uma característica de alta complexidade, pois é dependente de vários fatores, tais como o método de preparação, a natureza, massa molecular e

concentração do polímero utilizado, das propriedades físico-químicas (viscosidade, hidrofobicidade, organização estrutural) do composto a ser encapsulado, da concentração dos tensoativos, das proporções entre as fases, viscosidades velocidade de agitação, velocidade de difusão das fases, dentre outros^{34,45}.

ESPALHAMENTO DE LUZ DINÂMICO

Para determinar o tamanho das partículas, pode-se fazer uso do equipamento de espalhamento de luz dinâmico ou estático, do inglês Dynamic Light Scattering (DLS). O DLS permite, entre outras coisas, determinar o raio hidrodinâmico R_H (ou raio solvatado) das partículas e a distribuição de populações de diferentes tamanhos numa suspensão coloidal, chamado de Índice de Polidispersão (PDI). A técnica consiste em medir o espalhamento de luz que ocorre quando um raio luminoso incidente “colide” com as partículas, os detectores detectam as flutuações nas intensidades de espalhamento, uma vez que as partículas em suspensão estão se movimentando de forma aleatória, denominado movimento browniano. Os modelos matemáticos convertem e correlacionam a intensidade de espalhamento de luz com o raio hidrodinâmico das partículas, pois a intensidade do espalhamento depende principalmente do tamanho da partícula, do ângulo de incidência, do índice de refração e viscosidade do meio e do comprimento de onda do laser^{52,53}.

A leitura do espalhamento pode ser realizada em vários ângulos na forma de varredura angular, para aumentar a sensibilidade da análise, uma vez que as partículas estão em constante movimento ou em um ângulo fixo.

Os valores de PDI e R_H podem ser diretamente obtidos do software do equipamento, o R_H é calculado através da relação de Stoke-Einstein.

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta R_H} \quad (\text{Equação 2})$$

Esta equação relaciona o coeficiente de difusão D , com a constante de Boltzmann k , multiplicada pela temperatura T em Kelvin, sob seis vezes o valor de π , que multiplica a viscosidade do solvente η e o raio hidrodinâmico da partícula R_h em solução.

A aplicação da fórmula de Stoke-Einstein só é possível se for assumido que as partículas se movimentam de forma aleatória (movimento Browniano) e que as partículas são esféricas e que não interagem umas com as outras, logo estariam na condição de diluição infinita⁵³.

O equipamento de DLS consiste em um goniômetro acoplado a um laser que passa por duas lentes colimadoras. A primeira lente serve para focar a trajetória do raio luminoso para atravessar a amostra de forma a evitar as bordas da célula, ao atravessar a célula da amostra, ocorre o espalhamento da luz incidente, que em seguida passa por uma segunda lente colimadora para juntar os raios de luz espalhados para serem detectados e amplificados por um fotomultiplicador e por último, a variação da intensidade de luz é convertida em variação de voltagem segundo modelos matemáticos, pelo correlator acoplado ao equipamento, esquema representado na **Figura 10**.

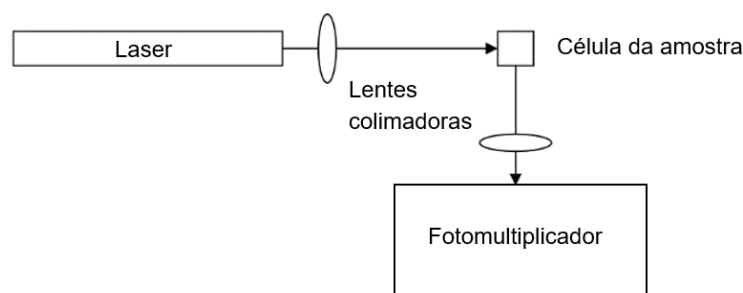


Figura 10 - Esquema simplificado de um goniômetro de espalhamento de luz dinâmica.

A medida do tamanho da partícula via a utilização do DLS é muito viável, pois esta técnica não é invasiva, ou seja mantém a integridade do composto, requer pouca quantidade de amostra, é boa para detecção de traços entre agregados (as partículas menores apresentam maior difusão da luz), dentre outras características^{49,54,55,56}.

POTENCIAL ZETA

Assim como o tamanho e a dispersão de diferentes populações coexistindo na amostra, é interessante conhecer as características da superfície da partícula⁴⁹. Isso pode ser realizado em termos da morfologia, com o emprego de alguma técnica de microscopia ou ainda verificando a carga superficial das mesmas. A carga superficial das partículas pode ser determinada por meio da medida do potencial zeta (ζ) após exposição das mesmas a um campo elétrico. Este potencial é calculado em função da

mobilidade eletroforética das partículas. As partículas em suspensão apresentam carga superficial positiva ou negativa, em que a magnitude depende das moléculas presentes na superfície das mesmas. Assim, essa carga superficial, atrai eletrostaticamente os contra íons de carga oposta (presentes em solução), formando uma primeira camada de forte interação eletrostática, conhecida como camada de Stern. Uma segunda camada de contra íons se liga mais fracamente ao sistema. Esta segunda é chamada de camada difusa, pois sofre pouca atração pela carga da partícula que já está recoberta pela camada de Stern, a qual provoca uma repulsão na segunda camada, devido a mesma carga dos íons. O potencial zeta é o potencial electrocinético produzido no ponto de cisalhamento entre as duas camadas (**Figura 11**)⁵⁷.

A magnitude de ζ , é um indicativo da estabilidade do sistema coloidal, pois representa o potencial de repulsão entre as partículas. Assim, valores de potencial zeta muito pequeno, em módulo, podem evidenciar a tendência de um sistema em formar agregados ao longo do tempo, pois as forças de repulsão entre as partículas é pequena ⁵⁸.

Segundo o manual MALVERN. Zetasizer Nano Series, sistemas particulados que apresentam potencial zeta próximo de ± 30 mV são considerados estáveis⁵⁹.

Outro fator a ser considerado quando se trabalha com medidas de potencial zeta, é o pH e a força iônica do meio pois esses fatores podem alterar a carga superficial das partículas e os efeitos de mobilidade eletroforética⁵³.

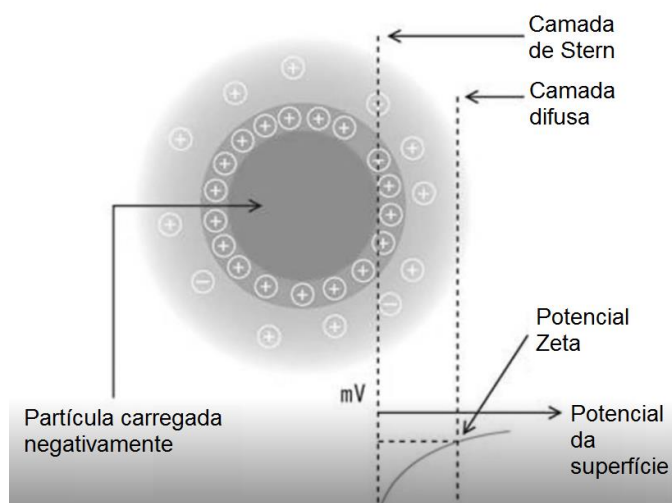


Figura 11 - Representação esquemática do modelo da dupla camada elétrica para uma partícula com carga superficial negativa.

3. Objetivos

3.1. Objetivo Geral

Promover a nanoencapsulação do resveratrol em nanopartículas de policaprolactona e avaliar a atividade fotoprotetora do resveratrol livre e nanoencapsulado frente à peroxidação lipídica em modelo in vitro de bicamada lipídica.

3.2. Objetivos específicos

- Preparar e caracterizar nanopartículas de policaprolactona contendo o resveratrol quanto ao tamanho, carga superficial e morfologia;
 - Determinar o teor e eficiência de encapsulação do resveratrol nos sistemas;
 - Avaliar pela técnica de espalhamento de luz dinâmico, a estabilidade das diferentes formulações ao longo de 60 dias;
 - Avaliar e comparar o efeito fotoprotetor do resveratrol livre e encapsulado frente à peroxidação lipídica.

4. Materiais e métodos

4.1. Materiais

4.1.1. Matérias-primas e reagentes

O trans-resveratrol (5-[(E)-2-(hidroxifenil)etenil]benzeno-1,3-diol, com pureza de aproximadamente 99%), triglicerídeos de cadeia média (TCM), policaprolactona (Massa molar média de $10.000 \text{ g mol}^{-1}$) e Tween 80 foram obtidos da Sigma Aldrich (St. Louis, EUA). A lecitina de soja (Lipoid S100) foi obtida da Lipids Ingredients (Brasil). A avobenzona (EUSOLEX 9020) adquirida de All Chemistry. O ácido 2-tiobarbitúrico foi obtido da Sigma Aldrich (St. Louis, EUA), e gentilmente cedido pelo Labioex (UFSC). Água ultrapura foi fornecida por sistema de purificação Milli-Q® (Millipore, Bedford, EUA). Os demais solventes e reagentes foram utilizados com pureza em grau analítico.

4.2. Equipamentos

- Agitador magnético (Dist, Brasil);

- Balança analítica Ohaus Corporation AS 2005 (EUA);
- Evaporador rotatório Buchi (Pensalab, Brasil);

4.3. Procedimento experimental

4.3.1. Preparação das nanocápsulas poliméricas

A preparação das nanocápsulas foi realizada segundo técnica de deposição interfacial do polímero pré-formado, conforme descrito por Nemen *et al.*,⁶⁰, com adaptações. Esta técnica consiste na adição de uma fase orgânica contendo o polímero, substância ativa, óleo e surfactante lipofílico em uma fase aquosa contendo um tensoativo hidrofílico, em que o solvente orgânico é completamente miscível⁴⁵. A fase orgânica foi composta por 75 mg de lecitina de soja (fosfatidilcolina), 100 mg de PCL ($MM_{\text{média}} = 10.000 \text{ g/mol}$) e 250 μL de triglicerídeos de cadeia média (TMC), solubilizados em 25 mL de uma mistura de solventes acetona:etanol 70:30. Quando a formulação incluía o resveratrol ou a avobenzona, estes foram adicionados na quantia de 1 mg cada, às formulações. Para a preparação da fase aquosa, 50 mg do tensoativo hidrofílico Tween 80 foram dissolvidos em água mili-Q na quantidade suficiente para 40 mL de solução. Com o auxílio de uma seringa, a fase orgânica foi lentamente injetada na fase aquosa, a qual foi mantida sob agitação magnética. As nanocápsulas foram formadas instantaneamente e as suspensões coloidais resultantes foram submetidas à evaporação sob pressão reduzida para eliminação do solvente orgânico e concentração até volume desejado de 10 mL. As suspensões coloidais finais foram armazenadas ao abrigo de luz a 4 °C.

4.3.1.1. Potencial zeta

As medidas do potencial zeta (PZ) das nanocápsulas foram feitas a 25 °C, empregando-se a técnica de microeletroforese associada a anemometria Doppler de laser. O equipamento utilizado foi o Zetasizer 3000 (Malvern, Reino Unido), operado com laser de He-Ne no comprimento de onda de 633 nm e no ângulo de 173 °. Uma alíquota de 100 μL de cada uma das amostras foi diluída em 2 mL de água mili-Q. As amostras foram colocadas em células eletroforéticas onde um potencial de $\pm 150 \text{ mV}$ foi aplicado. Os valores de potencial zeta (mV) foram calculados a partir da média dos valores de mobilidade eletroforética, utilizando a equação de Smoluchowski. O potencial zeta foi avaliado logo após a preparação das suspensões coloidais e após

60 dias de armazenamento, bem como diluídas em pH tamponado próximo de 7. As análises foram realizadas em triplicata.

4.3.1.2. Morfologia

A morfologia foi avaliada por microscopia de transmissão eletrônica no microscópio JEM-1011 TEM no Centro de Microscopia Eletrônica da UFSC. As amostras, previamente diluídas com água ultrapura (10 µL em 2 mL), foram depositadas em grids de cobre revestidos com carbono e coradas pela adição de uma gota de ácido fosfotungístico 0,1% (m/V).

4.3.1.3. Avaliação do teor e eficiência de encapsulação do resveratrol

A determinação do teor de resveratrol e da eficiência de encapsulação foi realizada pela técnica de espectrofotometria de absorção no ultravioleta no comprimento de onda de 304 nm, definido após varredura espectral de 400 a 240 nm. Construiu-se uma curva de calibração do RVTL livre em etanol e o teor ou concentração total do resveratrol (µmol/mL) foi determinado após dissolução completa das partículas em etanol. A concentração de resveratrol livre (não encapsulado) foi determinado no sobrenadante obtido após sucessivas centrifugações das suspensões coloidais a 80.000 rpm durante 60 minutos em Ultracentrífuga Beckman. A concentração do resveratrol na suspensão total e no sobrenadante foi determinada após construção da curva de calibração de resveratrol livre em etanol. A eficiência de encapsulação foi estimada como sendo a diferença percentual entre a concentração total de resveratrol inicialmente adicionado e aquela encontrada no sobrenadante. As análises foram realizadas em triplicata.

4.3.1.4. Avaliação da estabilidade das suspensões de nanocápsulas contendo resveratrol

A estabilidade das suspensões de nanocápsulas foi avaliada por um período de dois meses após o armazenamento em condições de luz e temperatura ambiente. Durante esse período, o tamanho e o índice de polidispersidade das partículas foram semanalmente avaliados pela técnica de espalhamento de luz dinâmico. O espalhamento da luz foi realizado com as suspensões diluídas em água após terem sido filtradas em filtro Millipore de 0,45 µm, levando-se em conta os parâmetros do solvente, como o índice de refração e a viscosidade. As análises foram conduzidas a

temperatura ambiente, com um goniômetro de laser polarizado a 632,8 nm e um correlator Tau digital AVL / LSE- 5004. As análises foram realizadas em ângulo de detecção de 90 ° e a distribuição e o tempo de relaxação foram obtidos utilizando as análises CONTIN com as funções de auto correlação⁶¹.

4.3.1.5. Avaliação da atividade fotoprotetora do resveratrol livre e nanoencapsulado em modelo de peroxidação lipídica

Os ensaios de peroxidação lipídica *in vitro* foram conduzidos usando filmes de fosfatidilcolina como modelo de membrana, conforme metodologia descrita na literatura^{9,62}. Para tal, a lecitina de soja (Lipoid S100, 100% fosfatidilcolina) foi solubilizada em clorofórmio na concentração de 10 mmol.L⁻¹. Para os ensaios, alíquotas de 1 mL da solução de fosfatidilcolina foram transferidas para uma placa multipoços. Após a evaporação do solvente, os filmes formados foram hidratados com 1,5 mL de tampão fosfato-salino pH 7,4 contendo 0.1 mmol.L⁻¹ de EDTA. Os filmes foram expostos à radiação UVA durante 12 horas, com o emprego de uma lâmpada UVA comercial (PHILIPS Lighting, modelo Actinic BL TL TL 8W/10), posicionada a uma distância de 2 cm das amostras, dentro de uma câmara escura. Após a exposição à radiação, a extensão da lipoperoxidação foi avaliada usando o ensaio do ácido 2-tiobarbitúrico (TBA)^{9,56}. Para este ensaio, 2 mL do reagente TBA-TCA-HCl (0,375% de massa por volume de TBA, 15% de massa por volume de TCA e 0,2 mol.L⁻¹ de HCl) foi adicionado à 1 mL de amostra contendo 1 mL de butil-hidroxitolueno (BHT) 0,3 mmol.L⁻¹ para prevenir a peroxidação da fosfatidilcolina durante o ensaio de TBA. As amostras foram mantidas por 30 min em banho termostatizado a 95° C e em seguida resfriadas. A solução resultante foi analisada por espectrofotometria a 530 nm, comprimento de onda característico definido pela varredura do aduto MDA:TBA. Utilizou-se como branco para cada amostra uma solução controle que continha exatamente a mesma formulação que a respectiva amostra, mas que foi mantida ao abrigo da luz e sob temperatura de 4 °C durante a exposição à radiação e submetida ao ensaio TBARS. A curva de calibração do padrão MDA foi construída a partir da hidrólise ácida do reagente 1,1,3,3-tetrametoxipropano (TMP). Assim, transferiu-se 6 alíquotas de volumes de 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 e 3,0 mL de TMP 0,2 mM para balões volumétricos de 50 mL, como descrito na **Tabela 1**. Os balões foram em seguida completados com uma solução de TCA 10% (m/V) em água. De cada solução retirou-se uma alíquota de 5 mL que foram adicionadas em falcons que continham 5 mL de

TBA 0,02 M. Os falcons foram fechados e submetidos a banho de água fervente a 95 °C por 40 minutos. Após este período os falcons foram rapidamente resfriados em banho de gelo, por 5 minutos e as leituras foram realizadas a 530 nm quando as soluções alcançaram a temperatura ambiente. Para a leitura do “branco” empregou-se a mistura de 5 mL de TBA 0,2mM com 5 mL de TCA 10%.

Tabela 1 - Volumes e correspondentes concentração de TMP adicionados para cada ponto da curva de calibração.

Amostra	Concentração final ($\mu\text{mol/L}$)	Volume de TMP 0,02 M adicionado (mL)
C0	2,0	0,5
C1	4,0	1,0
C2	6,0	1,5
C3	8,0	2,0
C4	10,0	2,5
C5	12,0	3,0

5. Resultados e discussão

5.1. Avaliação da estabilidade das suspensões de nanopartículas contendo resveratrol

Como as atividades biológicas e biodisponibilidade dos compostos encapsulados depende dos parâmetros físico-químicos dos sistemas nanoparticulados, é de fundamental importância conhecer algumas características tais como polidispersidade, distribuição média do tamanho das partículas, bem como a morfologia e a carga superficial das partículas⁶³.

Assim, as nanopartículas foram caracterizadas em termos de distribuição do raio hidrodinâmico correlacionado com a distribuição do tempo de decaimento e índice de polidispersão. Além da caracterização dos sistemas, este estudo teve como objetivo analisar a estabilidade das partículas frente a formação de agregados ao longo do tempo. Foi feita uma análise comparativa, no tempo zero, entre a varredura

angular (de 30 a 150 ° com um incremento de 10 °) e a leitura no ângulo fixo de 90 °. Os valores são apresentados na **Tabela 1**.

Para a obtenção de dados descritos na **Tabela 1**, foi feita a média aritmética dos valores encontrados para cada triplicata, e com isso foi possível calcular o respectivo desvio padrão. O erro relativo foi calculado assumindo como valor teórico o R_H encontrado pela varredura angular.

Tabela 2 - Estudo comparativo entre o raio hidrodinâmico obtido pela varredura angular e pelo ângulo fixo de 90 °.

Amostra	R_H (nm) Varredura angular 30 a 150°	R_H (nm) 90°	Erro relativo (%)	Desvio padrão (±) De R_H a 90°	PDI	Desvio padrão (±)
NB	140,7	139,8	0,6	0,0707	0,092	0,0361
NA	95,23	93,97	5,0	0,813	0,116	0,0634
NR	89,61	97,48	8,2	0,870	0,124	0,0021
NRA	104,7	115,8	10,6	1,06	0,160	0,0253

Com isso, ficou evidenciado que o tamanho das partículas em função do tempo pode ser estudado a 90° sem apresentar uma significativa discrepância em relação ao raio hidrodinâmico encontrado na varredura angular, pois os erros calculados são relativamente pequenos, apresentando um erro considerável de 10,6% apenas para a amostra NRA. Os índices de polidispersão determinados no tempo zero, indicam que as suspensões estão pouco polidispersas, logo estariam mais homogêneas, apresentando poucas populações de diferentes tamanhos de partícula.

O menor tamanho para as partículas contendo RVTL ou AVO em comparação com as nanopartículas puras (NB) sugere uma interação destes ativos com os compostos da formulação, o núcleo oleoso e a parede polimérica. Estes resultados são similares aqueles descritos por Caddeo *et al.*,⁶⁴. Estes autores verificaram uma redução de tamanho, de 113 nm para vesículas lipídicas brancas para aproximadamente 92 nm, quando o resveratrol foi encapsulado. Os resultados de

Coradini *et al.*, também demonstraram que os componentes da formulação e as suas quantidades interferem nas características das dispersões coloidais resultantes. Fazendo uso da técnica de DLS, estes autores caracterizaram nanocápsulas de PCL com RVTL encapsulado, obtidas pelo método de nanoprecipitação, contendo no entanto, óleo de semente de uva ao invés de TCM (utilizados no presente trabalho). Encontrando o raio hidrodinâmico de 200 nm e PDI de 0,08⁶⁵, em contrapartida as condições empregadas neste trabalho resultaram em nanopartículas menores, com R_H próximo de 100 nm e PDI levemente superior, de 0,124. Que pode ser explicado pela diferença de viscosidade do triglicerídeo, a sua hidrofobicidade, dentre outros fatores, pois segundo Schaffazick *et al.*, a natureza do óleo empregado afeta consideravelmente o diâmetro das nanopartículas^{58,66}.

As curvas da frequência de relaxação (Γ) em função do quadrado do vetor de espalhamento q , são lineares o que indica que a difusão é translacional (**Figura 12**). Sabendo que Γ é diretamente proporcional ao coeficiente difusional (Equação 3)⁵² e que D é inversamente proporcional ao raio hidrodinâmico (Equação 2), tem-se que o coeficiente de difusão das partículas é a inclinação da reta (coeficiente angular)⁶⁷.

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta R_H} \quad (\text{Equação 2})$$

$$\Gamma = Dq^2 \quad (\text{Equação 3})$$

Com isso foi possível determinar os raios hidrodinâmicos das partículas.

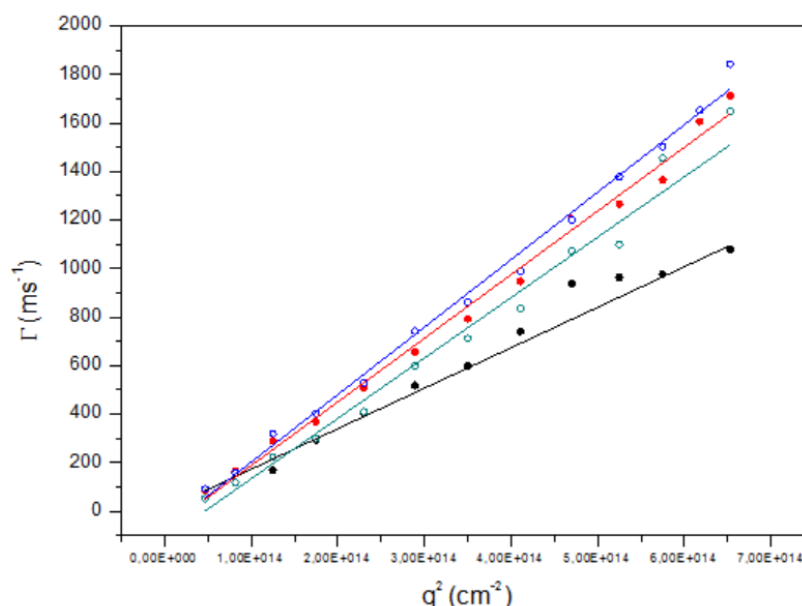


Figura 12 - Curvas da frequência de relaxação pelo quadrado do vetor de espalhamento apresentam no mínimo $r^2 = 0,979$, segundo a legenda: (•) NB, (•) NA, (•) NR e (•) NRA.

Partículas maiores tem um espalhamento de luz mais lento, o que cria uma relação de menor frequência de relaxação, e ao mesmo tempo possuem maior intensidade de espalhamento em função do tempo. Assim quanto maior o raio hidrodinâmico, menor o coeficiente de difusão e consequentemente menor frequência de relaxação⁵³.

No gráfico da **Figura 12** é possível analisar que as partículas de maior R_H , NRA e NB, são as que possuem menor inclinação da reta, logo menor D . Já as curvas de NR e NA que são os sistemas que apresentam menor R_H , 89,61 nm e 95,23 nm respectivamente, possuem maiores valores de coeficientes de difusão e frequência de relaxação. Pois partículas pequenas espalham a luz mais rapidamente, logo tem menor taxa de intensidade de espalhamento em função do tempo. Apresentando $\Gamma_{\text{máximo}}$ de 1800 s^{-1} para NR e 1700 s^{-1} para NA em comparação com $\Gamma_{\text{máximo}}$ de 1600 s^{-1} para a formulação NRA e 1100 s^{-1} para NB.

Analisando as curvas de correlação em função de τ (**Figura 13**) é possível observar que as amostras NB, NA e NR apresentam correlações semelhantes e próximas do limite teórico 1 enquanto a formulação NRA apresenta uma correlação mais baixa próxima de 0,83 que representa uma menor amplitude da função de correlação para esse sistema, devido ao seu maior valor de PDI, indicando que a

suspensão NRA tem maior polidispersidade do que as demais amostras. O que também é verificado na **Figura 14**, onde tem-se um menor tempo de decaimento para as formulações NR e NA, pois partículas menores decaem mais rapidamente do que as grandes.

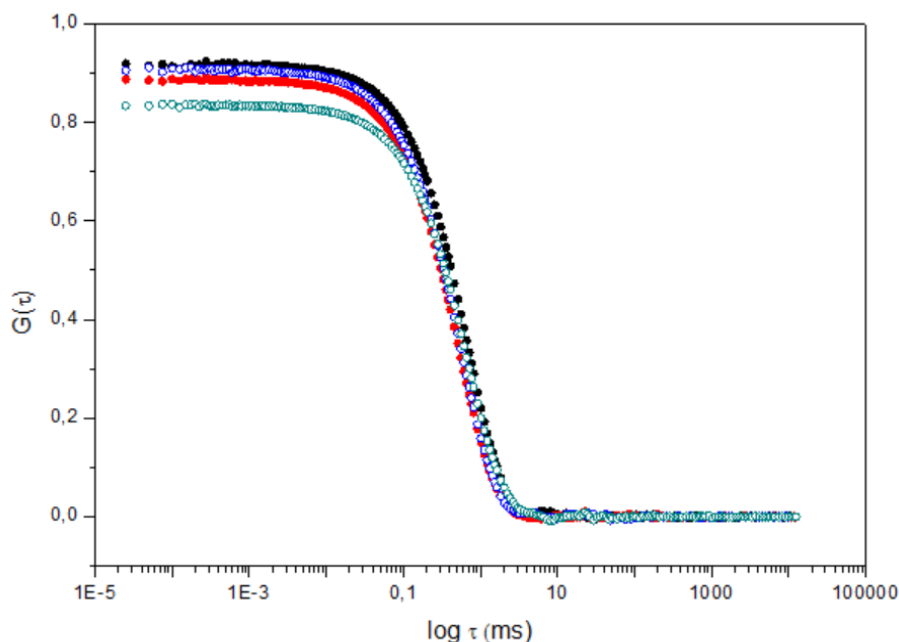


Figura 13 - Curva em função do logaritmo da distribuição do tempo de decaimento a 90°, legenda: (●) NB, (●) NA, (○) NR e (○) NRA.

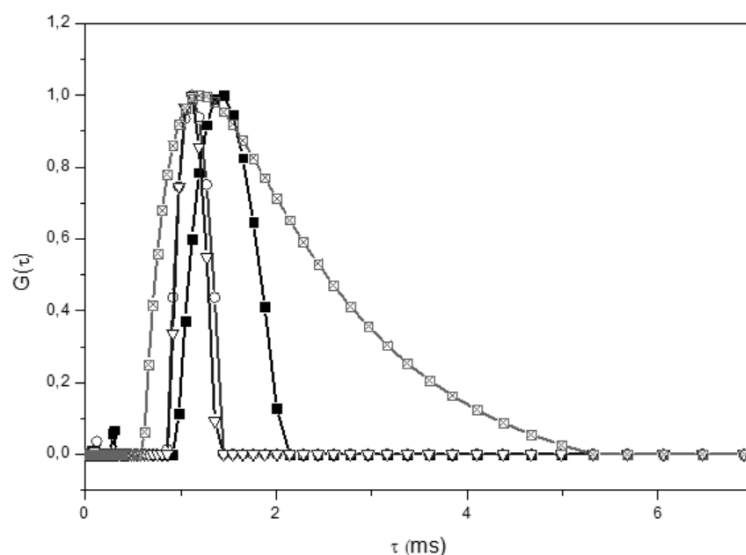


Figura 14 - Distribuição do tempo de decaimento a 90°, legenda: (■) NB, (○) NA, (▽) NR e (□) NRA.

A polidispersidade das amostras também pode ser observada no gráfico que correlaciona a distribuição dos raios hidrodinâmicos das partículas (**Figura 15**), onde a curva da suspensão NRA está mais espalhada, indicando a maior polidispersidade

da amostra. Este resultado pode ser um indicativo de formação de partículas de diferentes composições dos ativos RVTL e AVO.

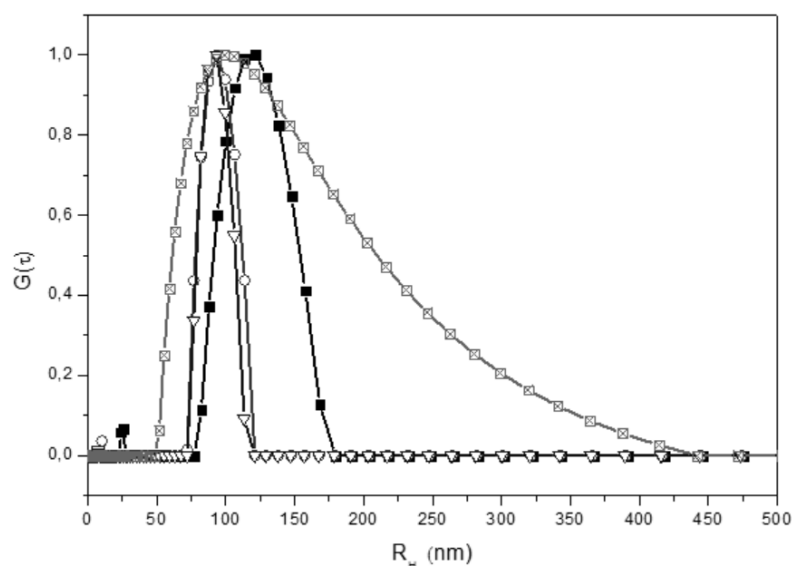


Figura 15 - Gráfico da distribuição do raio hidrodinâmico da partícula a 90° legenda: (■) NB, (○) NA, (▽) NR e (□) NRA.

Além do fator de alargamento do pico, pode-se observar a existência de mais de um pico para as formulações NB, NA e NR, justificando a existência de diferentes tamanhos de partículas coexistindo em suspensão, indo de acordo com os valores de PDI acima de 0,1, encontrados para três das quatro formulações analisadas⁶⁸. A baixa intensidade dos picos pode estar relacionada com o reduzido tamanho e quantidade das partículas dessas populações.

Após o período de 60 dias, foi construído o gráfico que apresenta o tamanho do raio hidrodinâmico em função do tempo (**Figura 16**).

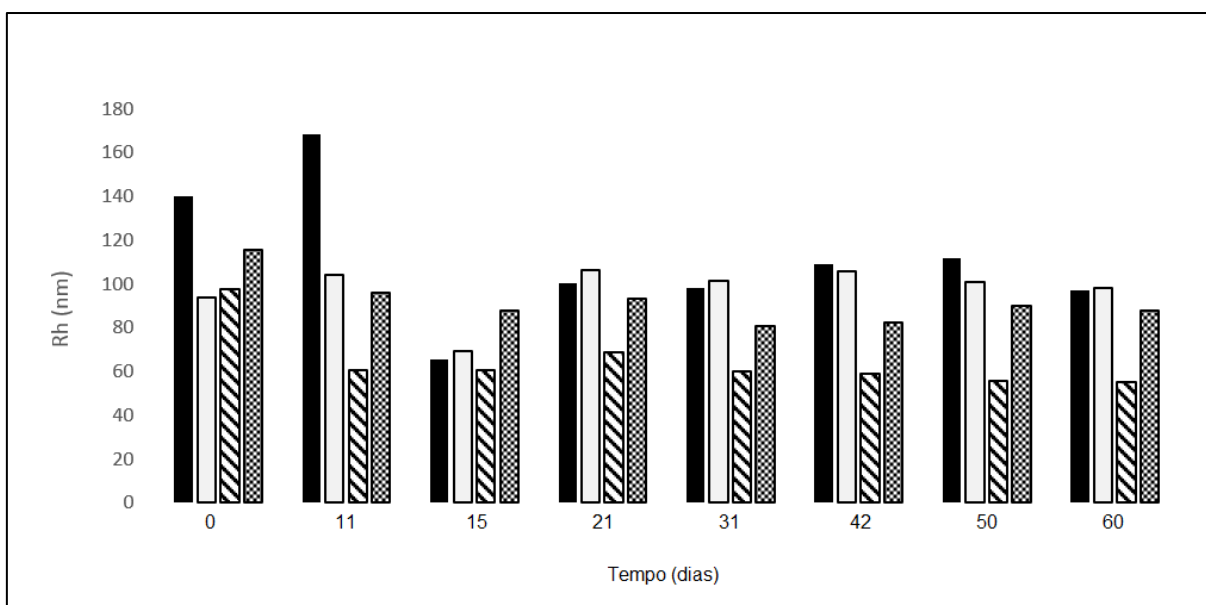


Figura 16 – Estudo dos raios hidrodinâmicos em função do tempo de armazenamento, legenda: (■) NB, (□) NA, (▨) NR e (▩) NRA.

Observando o gráfico da **Figura 16**, pode-se verificar que no tempo zero os sistemas possuíam maiores valores de raios hidrodinâmicos, que foram diminuindo ao longo dos dias de armazenamento. Surgindo a hipótese de que após certo tempo (aproximadamente 15 dias), o sistema sofreu nova organização e a partir daí as suspensões mantiveram constância dos valores de R_H ao longo do tempo analisado. Pode-se pensar numa possível floculação e precipitação das partículas maiores, pois inicialmente as soluções eram muito concentradas, condições que propiciariam a formação de agregados, segundo estudos reportados por López-Nicolás *et al.*,²¹.

Os pequenos valores de índice de polidispersão (**Figura 17**) também acompanhados em função do tempo, vão de acordo com a hipótese anterior pois até o decimo quinto dia os valores de PDI aumentam até alcançarem um valor máximo, e a partir de então, esses valores diminuem e mantem-se praticamente constantes ao longo do tempo. Estes valores abaixo de 0,3 denotam que as suspensões se mantiveram pouco polidispersas, com a tendência das nanopartículas de manterem-se em suspensão sem grandes formações de agregados.

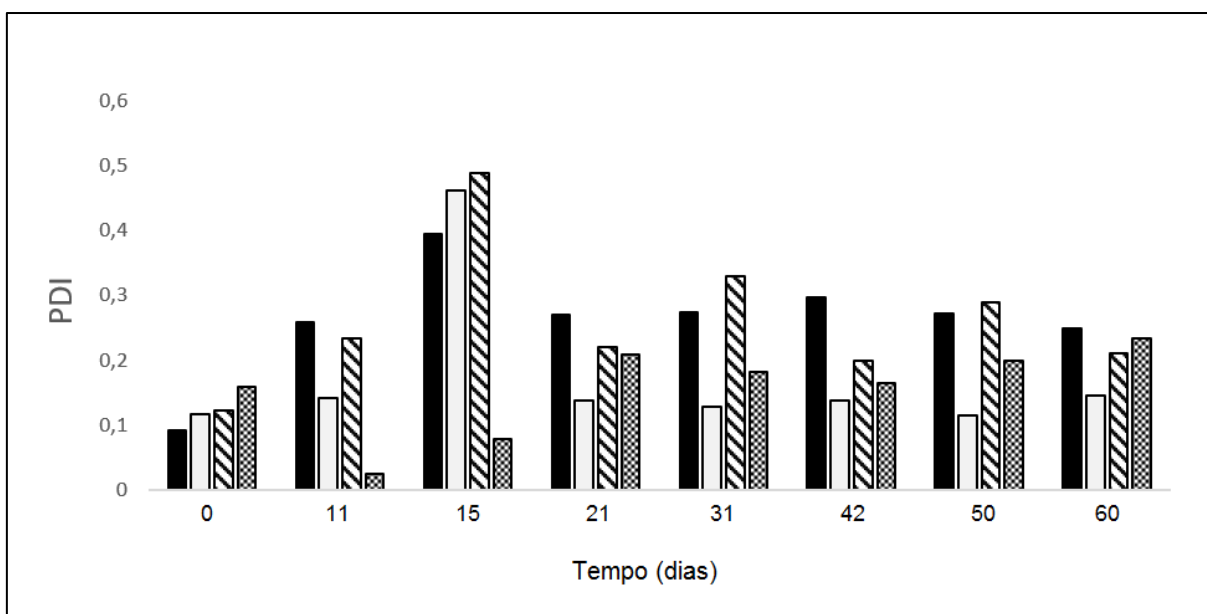


Figura 17 – Valores de PDI encontrados para cada suspensão em função do tempo de armazenamento,

Legenda: (■) NB, (□) NA, (▨) NR e (▩) NRA.

PDI é o índice de poli dispersão que segundo o National Institute of Standards and Technology deve ser $<0,05$ para garantir uma estreita distribuição entre o tamanho das partículas, logo uma solução com partículas monodispersas^{68,69}. Para os sistemas estudados neste trabalho, os valores de PDI encontraram-se abaixo de 0,48 ao longo do tempo, indicando uma baixa polidispersidade, sendo a formulação de NA a que apresentou maior consistência ao longo do tempo.

5.2. Potencial Zeta

Com o intuito de investigar o mecanismo de estabilização, as suspensões foram submetidas a análise de potencial Zeta (PZ), para melhor conhecer o comportamento das cargas superficiais das nanopartículas. Obteve-se um potencial zeta (ζ) negativo para todas as formulações. Os valores resultantes da média aritmética das triplicatas estão apresentados na **Tabela 3**.

Tabela 3 - Valores de potencial zeta (PZ) obtidos a temperatura ambiente no tempo zero e após 60 dias de armazenamento.

Amostra	PZ (mV) no tempo zero ^a (M ± d.p.)	PZ (mV) após 60 dias ^a (M ± d.p.)	pH após 60 dias	PZ (mV) amostras em PBS ^b	pH amostras em PBS ^b
NB	-14,6 ± 0,379	-19,8 ± 0,990	4,05	-16,8	6,35
NA	-14,5 ± 0,311	-28,2 ± 0,778	4,38	-15,0	6,57
NR	-19,2 ± 0,351	-20,7 ± 0,212	3,80	-13,8	6,62
NRA	-13,5 ± 0,286	-21,3 ± 2,121	3,94	-12,2	6,24

^aamostras diluídas em água ultrapura.

^bamostras diluídas em tampão PBS pH 7,4.

O pH das suspensões foi determinado com o intuito de caracterizar estes sistemas quanto à carga superficial das partículas, o estado de agregação e o potencial de aplicação biológica. De acordo com Aggarwal *et al.*, em pH acima de 8,1 já pode ser observada a primeira desprotonação do resveratrol e esse hidrogênio (do grupo p-4-hidroxil que é o mais ácido), é o que possui maior contribuição para as atividades biológicas do resveratrol, sendo assim indispensável conhecer o pH do meio para poder avaliar o seu poder antioxidante²⁰. De acordo com Schaffazick *et al.*, o baixo valor de pH encontrado para as suspensões poliméricas pode ser devido ao polímero empregado. Segundo os autores ao longo do tempo o PCL vai se reorganizando permitindo uma maior relaxação das cadeias poliméricas. Isso implica numa maior exposição dos grupos carboxilados para o meio, e esses ácidos carboxílicos podem sofrer dissociação, ou hidrólise contribuindo para acidificar o meio^{58,70}.

No tempo zero, os valores de PZ nas formulações NB e NA são estatisticamente próximos, porém após 60 dias é possível verificar um aumento significativo do PZ de NA em módulo (de -14,5 mV para -28,2 mV), indicando uma possível reorganização do sistema. De modo geral, no tempo final de análise todas as formulações apresentaram uma diminuição no valor de potencial zeta, segundo as mesmas condições de diluição. Também foi evidenciada a dependência do PZ com o pH, pois as suspensões apresentaram relativa diminuição em módulo, dos valores de potencial, quando dispersas num meio tamponado a um pH mais próximo da neutralidade.

Resultados similares foram obtidos por Coradini *et al.*, no desenvolvimento de nanocápsulas de PCL contendo resveratrol.⁶⁵ Em meio ácido, estes autores encontraram valores de PZ de -20,7 mV para as nanocápsulas contendo resveratrol. No entanto este valor foi reduzido à metade, para cerca de -10.2 mV, quando o pH da suspensão estava próximo da neutralidade. Com isso, estes autores demonstraram a influência do pH na caracterização e na estabilidade destes sistemas em diferentes meios, visto que PZ próximos de ± 30 mV causam a repulsão eletrostática das partículas, gerando sistemas mais estáveis⁵⁹. Schaffazick *et al.*, descrevem que a fosfatidilcolina (lecitinas) e o tween 80 são capazes de influenciar no PZ medido, a lecitina contribui para aumentar o potencial negativo da interface enquanto o polisorbato, mesmo sendo um surfactante não iônico é capaz de interferir no potencial resultante⁵⁸.

De modo geral os valores encontrados para o potencial zeta, são intermediários, o que pode indicar que as suspensões têm forças repulsivas capazes de estabilizar eletrostaticamente o sistema ao longo do tempo, minimizando a formação de agregados⁷¹. Essa estabilização foi observada nos estudos com o DLS, que indicaram que após a segunda semana de formação, os sistemas nanoparticulados mantiveram os seus valores de R_H constantes e baixos valores de PDI. Esses resultados sugerem que o mecanismo de estabilização das nanopartículas pode ser advindo da repulsão eletrostática, mas também outro efeito pode ser acrescentado, como demonstrado em estudos de Mitchnick *et al.*, onde a estabilização das partículas foi resultante do impedimento estérico proveniente da tensoativo adsorvido na interface da partícula, neste contexto pode-se relacionar o surfactante hidrofílico utilizado, o Tween 80. Esta molécula, quando adsorvido a interface das nanopartículas de PCL pode proporcionar maior efeito estérico devido as suas longas e ramificadas cadeias, dificultando a aproximação e agregação das partículas e contribuindo para maior estabilização do sistema⁷².

5.3. Morfologia

As micrografias das suspensões coloidais evidenciaram a morfologia esférica das nanopartículas (**Figura 18 à Figura 20**) e diâmetro similar aos valores médios obtidos por espalhamento de luz dinâmico, indicando que a secagem das suspensões sobre os grids não afetou o tamanho das mesmas. Geralmente os diâmetros

encontrados na técnica de microscopia de transmissão eletrônica são menores do que no DLS, pois com o TEM as partículas estão secas sobre um grid, enquanto o espalhamento de luz mede o raio solvatado das partículas em suspensão.

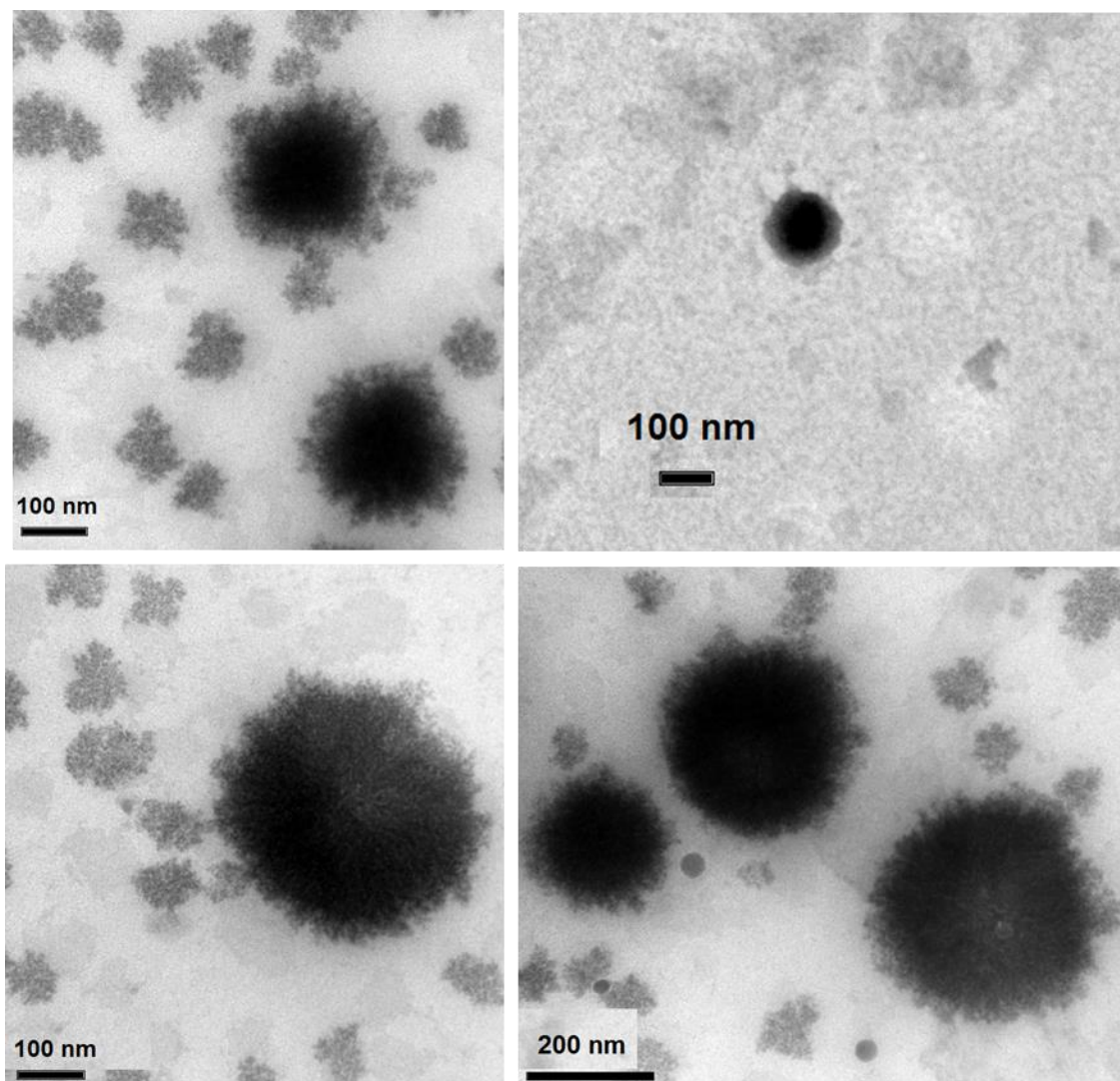


Figura 18 - Micrografia das nanopartículas com RVTL encapsulado (NR).

As nanopartículas NR, apresentadas na **Figura 18** demonstram um acúmulo de corante fosfotungístico, o qual foi diluído nas análises posteriores. O que impossibilita a observação do tamanho real das partículas, os raios observados nas micrografias estão entre 80 e 100 nm e são maiores do que os encontrados no espalhamento de luz que são de aproximadamente 60 nm. Empregando o tratamento do software imageJ obtiveram-se raios hidrodinâmicos médios de 58,368 nm (n=10) para NR, 93,976 nm (n=10) para NA e 87,292 nm (n=20) para NRA.

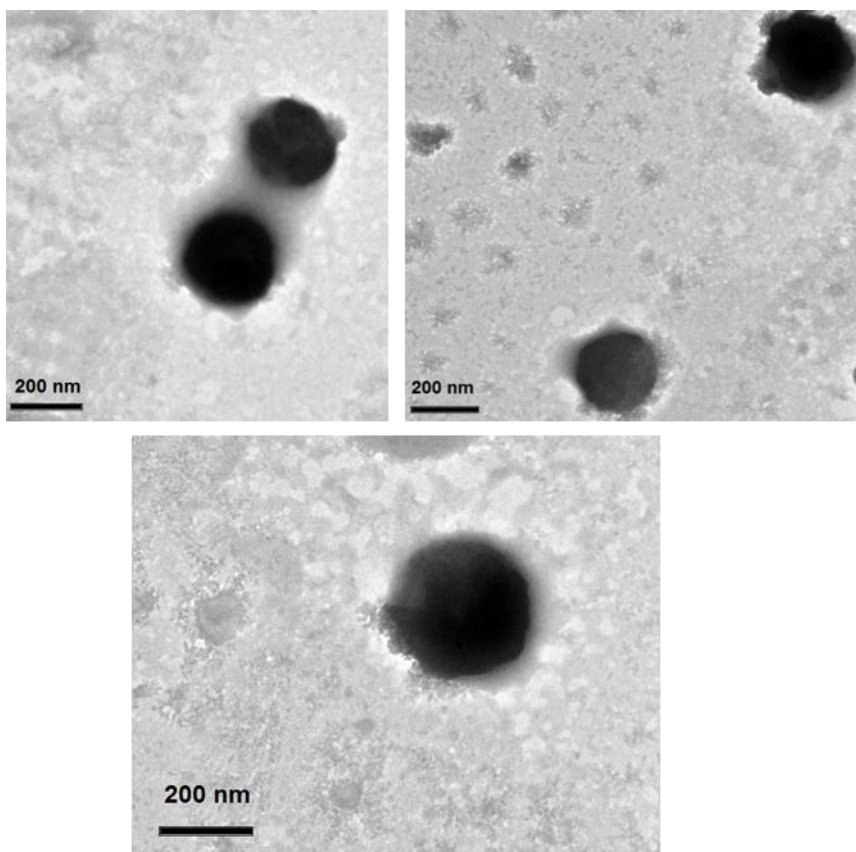


Figura 19 - micrografia das nanopartículas com AVO encapsulada (NA).

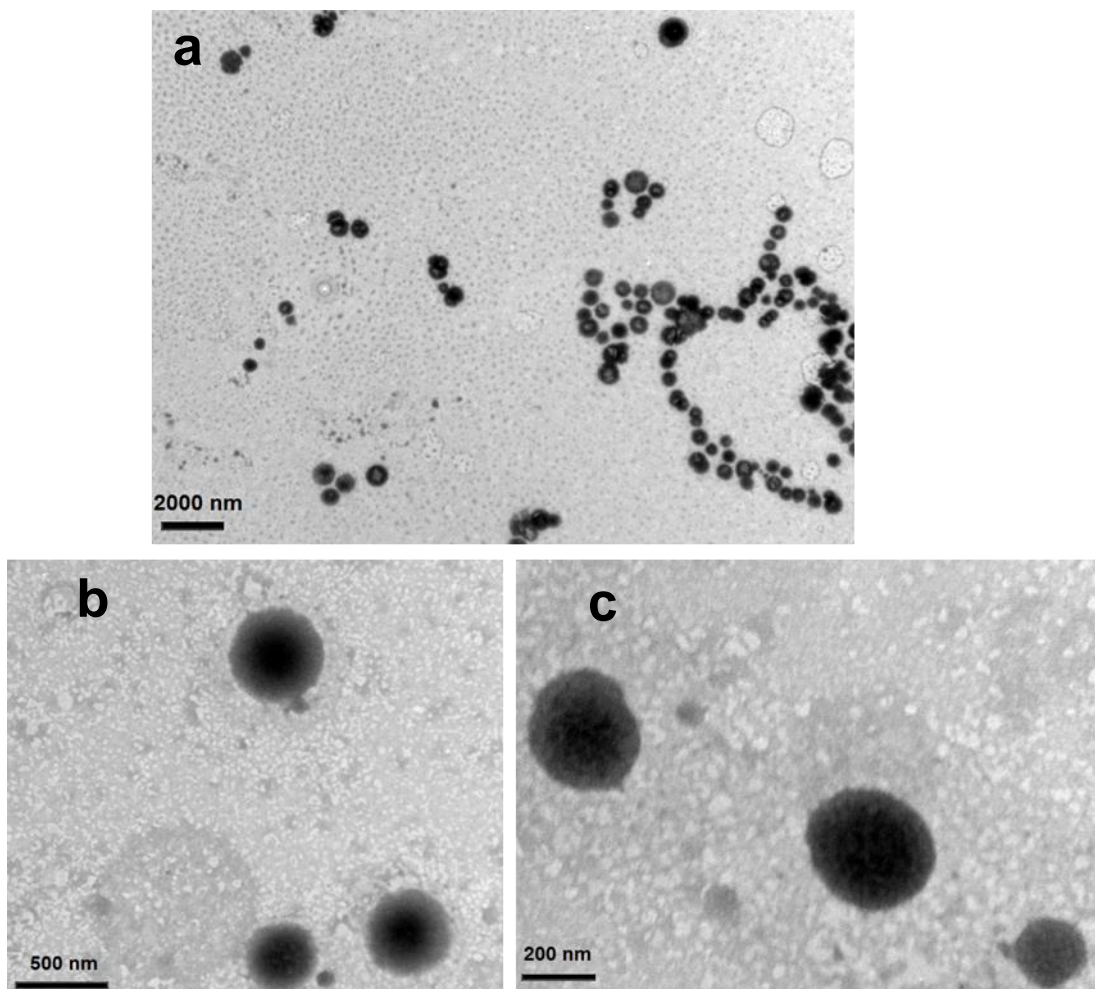


Figura 20 - micrografia das nanopartículas contendo AVO e RVTI encapsulados (NRA).

As micrografias de NR, NA e NRA mostraram partículas esféricas bem definidas. Na **Figura 20a** é possível observar uma significativa quantidade de partículas de tamanhos muito próximos (com raios entre 100 e 200 nm, aproximadamente), que está de acordo com o baixo valor de PDI ($< 0,2$) encontrado para essas formulações. Analisando as **Figura 20b** e **Figura 20c** foi possível perceber uma diferença de coloração que indicam a presença de partículas com diferentes regiões, sendo um núcleo mais denso, logo mais corado, e uma “parede” mais clara, característico da estrutura das nanocápsulas. Não foram obtidas as micrografias das nanopartículas brancas.

5.4. Avaliação do teor e eficiência de encapsulação do resveratrol

Para melhor conhecer o sistema formado pelo polímero e o ativo hidrofóbico, bem como avaliar a eficácia do método e das condições de nanoencapsulamento foi

determinado a eficiência de encapsulamento e teor do resveratrol nas suspensões coloidais.

Para tanto, um espectro de varredura no UV-VIS foi obtido para o RVTL e a AVO livres e para as formulações de nanocápsulas (**Figura 21**). Para comparar os espectros de absorção, uma alíquota de 5 μL de cada uma das amostras foi diluída em 4 mL de etanol. Em seguida as amostras foram submetidas à varredura na faixa de comprimento de onda de 400 a 240 nm. Análises prévias de 700 a 200 nm restringiram essa faixa de trabalho.

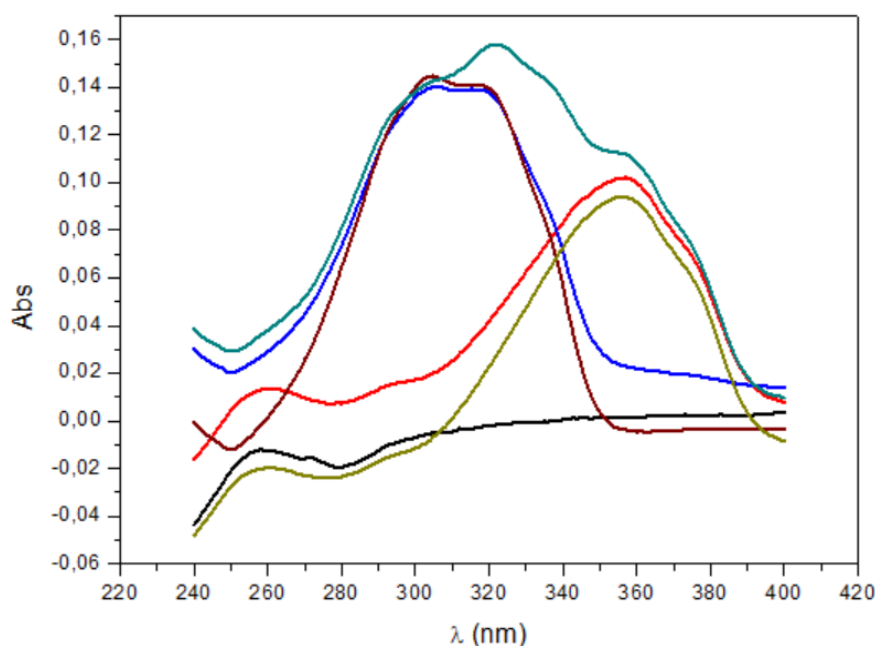


Figura 21 - Espectro de varredura obtido para o RVTL e AVO livres e para as nanocápsulas de PLC contendo as substâncias ativas em etanol. Legenda: (—) NB, (—) NA, (—) NR, (—) NRA, (—) RVTL livre e (—) AVO livre.

Observando o comportamento de NB é possível concluir que os componentes desta formulação apresentam uma absorbância pouco significativa no comprimento de onda de 304 nm, em que o RVTL apresenta o máximo de absorção. A suspensão coloidal NA indica que a avobenzona possui o máximo de absorção no comprimento de onda de cerca de 360 nm, existindo então uma diferença significativa de aproximadamente 56 nm entre os picos de máxima absorção dos dois componentes (RVTL e AVO). Assim, é possível afirmar que a absorção ocorrida em 304 nm é majoritariamente proveniente do RVTL presente na formulação.

A formulação NRA exibiu um perfil absorção resultante da sobreposição dos espectros de absorção do resveratrol e da avobenzona, sendo o pico de maior intensidade possivelmente oriundo de uma interferência construtiva, que poderia ocasionar um erro na leitura do teor de encapsulamento. Para tentar minimizar esse efeito, foram empregados como brancos de NR e NRA, NB e NA, respectivamente, nas mesmas condições de concentração (20 $\mu\text{mol/L}$).

Para determinação do RVTL nas suspensões coloidais foi construída uma curva de calibração do ativo puro em etanol, nas concentrações de 10; 15; 20; 25; 30 $\mu\text{mol/L}^{-1}$ (**Figura 22**). Os resultados estão expressos em unidade de absorbância por concentração de RVTL em $\mu\text{mol/L}^{-1}$.

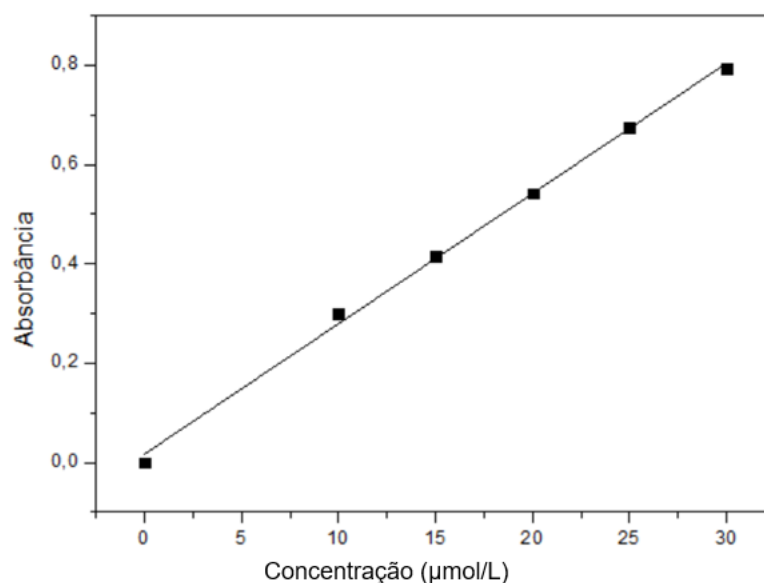


Figura 22 - Curva de calibração do RVTL em etanol.

Baseando-se nos estudos de AMRI *et al.*, que compararam a solubilidade do RVTL em diferentes solventes, optou-se por fazer a curva de resveratrol livre em etanol, em virtude de sua alta hidrofobicidade²¹.

A curva de calibração do RVTL mostrou ser linear na faixa de concentração analisada ($r^2 = 0,9973$) e equação da reta $y = 0,01699 + 0,26253x$. Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) do RVTL foram determinados através da relação entre o coeficiente angular (a , da equação da reta $y = b + ax$) com o desvio padrão médio da leitura de dez brancos (sd) (linha base). Com o $sd = 0,000347$, obteve-se:

$$LD = (3,3 \times sd)/a, \text{ logo: } LD = 0,00435 \mu\text{mol/L}$$

$$LQ = (10 \times sd)/a, \text{ logo: } LQ = 0,0132 \mu\text{mol/L} \quad (\text{Equação 4})$$

O valor de $\lambda_{\text{máximo}}$ obtido para o trans-resveratrol em etanol ficou muito próximo aos reportados na literatura¹⁵, sugerindo com isso que as substâncias que compõem as nanopartículas (polímero, solventes, tensoativos e outros) apresentam pouca influência na absorção do ativo, nas condições em que o experimento foi conduzido. Ficando assim justificada a seletividade do método de espectrofotometria de UV-VIS para determinação do teor e eficiência de encapsulamento do resveratrol.

Utilizando a relação de Lambert-Beer (Equação 5) foi possível determinar a absorvidade molar (ε) do resveratrol em etanol, a 304 nm.

$$A = \varepsilon \cdot b \cdot C \quad (\text{Equação 5})$$

Sendo A a absorvância da espécie naquele determinado comprimento de onda, ε a absorvidade molar, b é o caminho ótico (ou seja, a largura da cubeta) e C a concentração do composto.

Utilizando uma cubeta de largura de 1 cm:

$$\varepsilon = A/C \quad (\text{Equação 6})$$

Logo a absorvidade molar média calculada é igual a $27666,3 \text{ L.cm}^{-1}.\text{mol}^{-1}$. Pelo coeficiente angular da reta, encontra-se $\varepsilon = 26253 \text{ L.cm}^{-1}.\text{mol}^{-1}$, consequentemente pode-se verificar a coerência entre os valores encontrados assim como o valor descrito na literatura para o trans-resveratrol em etanol a 305 nm, aproximadamente 30000^{15} . Esse alto valor de absorvidade molar já era esperado devido as transições π - π^* das ligações duplas conjugadas do resveratrol⁷³.

Com o auxílio da curva de calibração, determinou-se o teor de resveratrol nanoencapsulado nas formulações NR e NRA, expressos na **Tabela 4** em função de média aritmética dos valores das triplicatas e dos seus respectivos desvios padrões.

Tabela 4 - Eficiência (EE) e teor de encapsulamento do ativo encontrados para estes sistemas nanoparticulados, realizados com as suspensões armazenadas por um período de 40 dias, ao abrigo de luz e temperatura de 4 °C.

Amostra	Teor de RVTL encapsulado (%)	Eficiência de encapsulação (%)
NR	71,8 ± 2,77	79,4 ± 0,001
NRA	80,4 ± 2,11	80,5 ± 0,002

Como as amostras foram previamente filtradas, em filtro qualitativo (7 mm), os resultados indicam que cerca de 20-30% do RVTL que foi inicialmente adicionado a formulação não foi encapsulado e foi filtrado na forma de precipitado, contudo os valores obtidos foram satisfatórios, indicando boa estabilidade do sistema, uma vez que a análise das suspensões foi realizada após 40 dias de armazenamento a 4 °C. A alta concentração inicial da suspensão pode justificar o efeito da formação de agregados e possível precipitação do ativo, como relatado por Aggarwal *et al.*,²⁰.

A EE do RVTL está de acordo com o reportado por Gokce *et al.*, que determinaram uma eficiência de 73% para o sistema de nanopartículas sólidas lipídicas contendo resveratrol⁷¹. Os valores neste caso são de aproximadamente 80 % para as duas formulações que contêm resveratrol em sua composição. Esse pequeno aumento de eficiência de encapsulamento pode ser devido a melhor formulação dos componentes de cada suspensão ou ainda devido a diferença na veiculação do ativo, pois Gokce *et al.*, apresentaram um sistema de nanopartículas sólidas lipídicas, enquanto no presente trabalho foram estudadas nanopartículas poliméricas de PCL. Entretanto Sanna *et al.*, também trabalharam com nanoencapsulamento de RVTL com sistemas de microcápsulas poliméricas de poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA) e quitosana, mas demonstraram menor eficiência de encapsulação, com um máximo de 52 %⁷⁴. Analisando somente a EE o PCL demonstrou maior compatibilidade com o ativo do que os sistemas de Gokce *et al.*, e Sanna *et al.*

O maior teor para a formulação NRA, ~10 % de diferença, pode indicar uma melhor estabilização do sistema quando composto por RVTL e AVO, sugerindo que estes interajam de forma a aumentar a estabilidade do sistema. Em concordância com

os valores obtidos para a eficiência de encapsulação, 79,4 % para a formulação NR e 80,5 % para NRA. Esses valores demonstram que todo o RVTL não encapsulado estaria disperso no meio aquoso, uma vez que o teor de ativo dentro das nanopartículas é de 80 % e a quantidade de ativo encontrado disperso no meio é de 20 %.

5.5. Avaliação da atividade fotoprotetora do resveratrol livre e nanoencapsulado em modelo de peroxidação lipídica

O comprimento de onda de máxima absorção do cromóforo rosa formado pelo malondialdeído (MDA) complexado com o ácido TBA é próximo de 530 nm⁷⁵, logo foi feita uma varredura de 600 a 400 nm para determinar o $\lambda_{\text{máximo}}$ do aduto MDA:TBA nas condições e no equipamento empregado (**Figura 23**). O pico de máxima absorção apareceu em 530 nm conforme descrito na literatura⁷⁵.

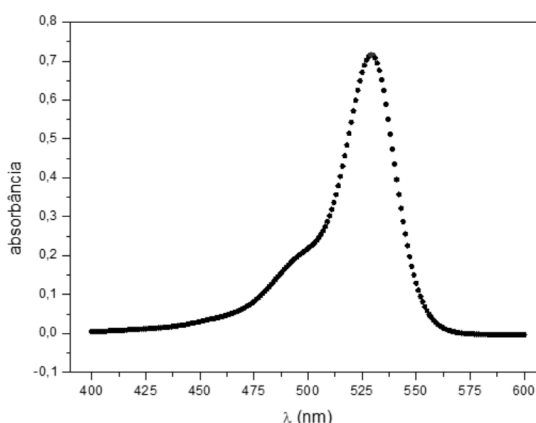


Figura 23 - Varredura espectral do aduto MDA:TBA.

Como o MDA é instável e tem forte tendência a polimerizar-se³³, fez-se a curva de calibração a partir do TMP. Segundo o handbook of food analytical chemistry a taxa de conversão do TMP para o MDA é de 1:1⁷⁶ (**Figura 24**), logo fez-se a curva com base nas concentrações finais almejadas para o malondialdeído.

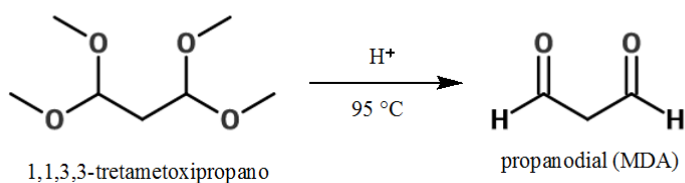


Figura 24 - Reação de formação do MDA a partir da hidrólise ácida do TMP.

A formação do cromóforo rosa possivelmente ocorre com o ataque nucleofílico do carbono 5 do TBA ao carbono 1 do MDA, aldeído que está na verdade em equilíbrio de enol-enolato. A reação é promovida em meio reacional ácido e sob aquecimento, inicialmente ocorre a desidratação do intermediário formado, seguido de mais um ataque de outra molécula de TBA, consequentemente o produto esperado é formado na proporção de uma molécula de MDA para duas de TBA⁷⁷.

A **Figura 25** apresenta a curva de calibração obtida com equipamento Agilent Cary 60, realizada no comprimento de onda de máxima absorção determinado por varredura espectral.

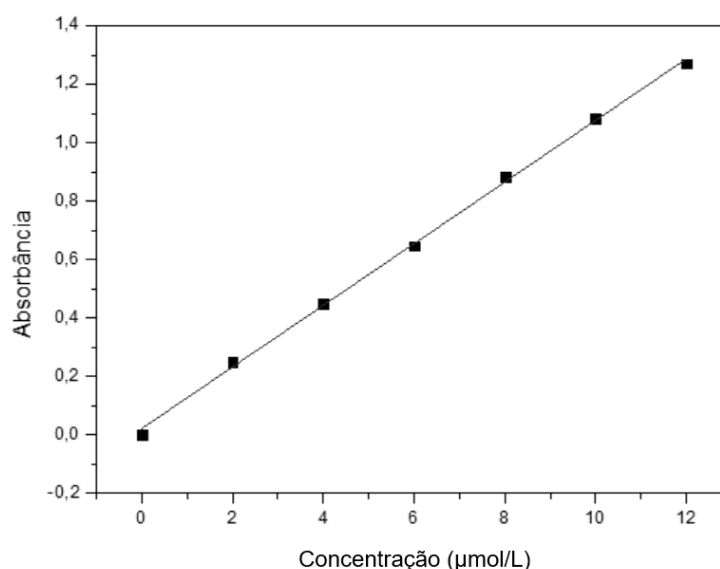


Figura 25 - Curva de calibração do MDA em água a 530 nm.

Com tratamento matemático obteve-se o $r^2 = 0,9986$, a equação da reta $y = 0,02124 + 0,10555x$ e o desvio padrão da leitura de 10 brancos, igual a 0,004745. Assim, calculando LD e LQ pela (Equação 4), temos:

$$LD = 0,1484 \mu\text{mol/L}$$

$$LQ = 0,4495 \mu\text{mol/L}$$

Para o ensaio de lipoperoxidação final foram feitas no total de 28 amostras (**Tabela 5**), sete formulações em quadruplicatas, sendo três irradiadas e uma mantida como controle. Tanto as suspensões NX quanto os ativos livres foram adicionados a concentração de $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ a fosfatidilcolina (FC).

Tabela 5 - Condições empregadas para o ensaio TBARS.

Condição	Composição
1	FC
2	FC + NB
3	FC + NA
4	FC + NR
5	FC + NRA
6	FC + AVO livre
7	FC + RVTL livre

Estudos prévios definiram a concentração de lecitina de 10 mM e o tempo de exposição de 12 horas, o qual foi necessário para produzir uma quantidade do cromóforo rosa perceptível entre as diferentes condições de análise. Analisou-se a quantidade de BHT empregada, realizando testes sem o conservante (condição A), com BHT na concentração usual (condição B) e com o antioxidante em concentração duas vezes maior que a usual (condição C). Neste ensaio preliminar, notou-se uma variação muito pequena entre estas últimas condições, logo optou-se pela condição B. A condição A em contrapartida, indicou que sem o BHT ocorre uma pequena formação do aduto MDA:TBA após a irradiação, por consequência do ataque ácido a fosfatidilcolina. Todas as condições empregadas tiveram uma amostra controle, de composição idêntica, que foi mantida na geladeira ao abrigo da luz e temperatura durante a irradiação. O BHT foi utilizado neste ensaio para evitar a lipoperoxidação durante o aquecimento das amostras com TBA, garantindo assim que todo o MDA formado fosse oriundo do processo de auto oxidação iniciado pela radiação. A sua atuação como antioxidante se dá exatamente na conversão do radical peroxíil em hidroperóxido lipídico, doando próton para atenuar o efeito radicalar, evitando que as abstrações de hidrogênios das moléculas vizinhas propaguem a degradação lipídica.

Utilizou-se a radiação para iniciar o processo de lipoperoxidação, fenômeno este que uma vez iniciado se auto propaga devido a formação de subprodutos

capazes de catalisar novas reações. Optou-se pela lâmpada UVA, uma vez que estudos de Pandel *et al.*, relataram que 90-95 % da radiação solar é composta por raios UVA e estes por sua vez são os maiores contribuintes para a formação de EROS⁷⁸.

Tendo em vista o amplo emprego da avobenzona nas formulações de protetor solar⁹, cuja absorção ocorre principalmente na região do UVA (320 a 400 nm), esta foi incorporada as formulações para fins comparativos no ensaio de lipoperoxidação do modelo de membrana. Desta forma, pôde ser estudado o comportamento isolado de cada ativo, bem como sua ação combinada para a proteção do modelo de membrana lipídica.

Após o ensaio TBARS, foi possível quantificar o aduto formado em cada uma das amostras analisadas. Os valores de MDA formado após irradiação das diferentes amostras estão dispostos na **Tabela 6**. Estes valores foram obtidos após a subtração da absorbância de cada uma das amostras empregadas como controle.

Tabela 6 - Valores de MDA formado após exposição das amostras à radiação UVA.

Condição	Concentração média de MDA (µM)
FC	0,1996
FC + NB	2,0186
FC + NA	1,2380
FC + NR	0,2249
FC + NRA	1,5244
FC + AVO livre	0,2209
FC + RVTL livre	1,5308

Analisando a **Tabela 6** foi possível perceber que todas os compostos adicionados a FC contribuíram para uma maior produção do aldeído resultante da degradação lipídica. Sendo a condição FC + NB que maior apresentou degradação. A condição FC + NRA desempenhou um papel intermediário frente a lipoperoxidação, porém demonstrando menor proteção do que as condições isoladas de NR e NA. A AVO apresentou melhor desempenho da sua forma livre frente a encapsulada, talvez devido a alguma interação com a nanopartícula polimérica ou ainda por uma menor liberação do composto para o meio. Com o RVTL ocorreu o inverso, a forma encapsulada demonstrou maior efeito fotoprotetor do que a sua forma livre, cerca de 7 vezes mais eficaz. Esse resultado está de acordo com Tadolini *et al.*, que reportaram o efeito do resveratrol na supressão do processo de degradação da membrana

fosfolipídica frente a lipoperoxidação via catalise metálica, com Ferro (II)³⁵. Além disso no estudo reportado por Coimbra *et al* o tempo de exposição é também um fator fundamental a ser considerado quando estudado o efeito fotoprotetor do composto. Pode-se pensar também que a potência da lâmpada utilizada não foi suficiente para produzir significativa quantidade de MDA, sendo necessário um maior tempo de exposição para poder analisar o efeito da lipoperoxidação. E este longo período de 12 horas de exposição pode ter sido crucial para a ocorrência de diversas reações de degradação dos ativos nanoencapsulados, gerando o resultado duvidoso⁷⁹.

Futuramente, poder-se pensar na extração do composto MDA do meio de análise, após a exposição à radiação UVA, ao invés de utilizar todo o meio reacional (FC, reagentes, solventes e etc). Além disso vale salientar que a espectroscopia não é a técnica mais sensível para quantificar o aduto MDA:TBA, pois a degradação da membrana fosfolipídica pode originar produtos que não reagem com o ácido tiobarbitúrico ou ainda o MDA pode formar subprodutos que também não são sensíveis a este ensaio, como descrito por Draper *et al.*,³⁴. Sendo assim, interessante realizar uma análise via HPLC ou algum método mais sensível para a quantificação da formação do malondialdeído. Estes autores também sugerem em sua pesquisa, que o emprego de EDTA no ensaio diminui em 22% a quantificação do aduto MDA:TBA. Observando assim mais uma possível fonte de erro.

Estudos de Afaq *et al.*, relacionaram a atividade fotoprotetora do resveratrol frente a radiação UVB *in vivo*¹. Este potencial biológico foi resultante de mecanismos diferentes do esperado no ensaio realizado no presente trabalho. Segundo Afaq *et al.*, a fotoproteção ocorreu mediante a inibição das enzimas ciclooxigenases, que propagam as inflamações cutâneas promovendo a proliferação de células tumorais^{20,81}.

Assim a maior proteção do RVTL nanoencapsulado frente a sua forma livre pode ter ocorrido devido a isomerização da forma livre do resveratrol, pois como descrito por Coimbra *et al.*, o isômero cis apresenta menor atividade biológica do que a sua forma trans⁷⁹.

6. Conclusão

As formulações foram preparadas conforme a metodologia proposta, resultando em sistemas estáveis ao longo de 60 dias, apresentando uma considerável modificação no tamanho do raio hidrodinâmico a partir da segunda semana de armazenamento. O que pode sugerir uma reorganização dos compostos para atingirem uma melhor estabilização do sistema. Os baixos valores encontrados para os índices de polidispersão também podem ser um indicativo que as suspensões mantiveram constância de tamanho de partículas ao longo do tempo, não apresentando assim numerosas populações de diferentes tamanhos, nem indícios de precipitação com aglomerações visíveis.

As micrografias realizadas por microscopia da transmissão eletrônica seguidas de tratamento estatístico do software imageJ resultaram em tamanhos de partículas de acordo com os previstos pelo espalhamento de luz dinâmico.

Os resultados obtidos para o potencial zeta concordam com a estabilidade encontrada no DLS, pois num primeiro momento as suspensões apresentaram baixas forças de repulsão eletrostática, porém ao final de dois meses os sistemas nanoparticulados foram novamente submetidos a análise, apresentando uma diminuição significativa para os valores de PZ, diminuindo numa média de -10 mV para cada formulação. Logo as suspensões mantiveram-se estáveis pois apresentaram valores PZ próximos do valor teórico ± 30 mV que indica a existência de fortes forças repulsivas.

Neste trabalho também foi brevemente verificada a importância de se conhecer o pH do meio analisado, devido a sua dependência com a análise de potencial zeta, entre outras coisas. Sugerindo maior estabilidade destes sistemas em pHs mais ácidos do que próximos a 7, pois contribuiriam para aumentar o efeito de repulsão eletrostática entre as nanopartículas, minimizando a formação de agregados.

A eficiência e o teor de encapsulamento demostram que o sistema polimérico e o TCM empregados são compatíveis e bons carreadores tanto para o resveratrol quanto pra avobenzona. Ainda assim acredita-se que o valor da eficiência de encapsulação não foi representativo da realidade de resveratrol fora das nanopartículas, pois mesmo com a ultracentrifugação não foi possível obter uma boa

separação do sobrenadante com o corpo de fundo, logo uma parte do ativo presente no corpo de fundo foi possivelmente analisado no sobrenadante, com isso espera-se que a eficiência tenha sido maior do que 80 % e que a quantidade de ativo não encapsulado tenha sido inteiramente removido na forma de precipitado.

No ensaio de lipoperoxidação apesar de ter sido encontrado um melhor resultado para a condição de resveratrol encapsulação frente a sua forma livre, maiores pesquisas se fazem necessárias para poder justificar o comportamento fotoprotetor do ativo devido ao fato da fosfatidilcolina pura apresentar menor formação do aldeído de degradação do que quando adicionado algum composto com suposto efeito fotoprotetor.

O meio tamponado das análises também pode ter contribuído para uma possível degradação ou modificação dos compostos. Assim tanto o RVTL quanto a Avo podem ter ajudado na formação de radicais livres, aumentando assim a peroxidação da membrana. Como a condição NB provocou um maior aumento na produção do aduto frente as outras condições, isso leva a acreditar que os compostos da formulação não são inertes ao ensaio, podendo degradar ou produzir subprodutos devido ao efeito da intensiva exposição à radiação eletromagnética.

O pequeno tamanho das partículas encontradas na formulação NR, comparativamente com as outras formulações, também pode ter influenciado numa melhor proteção da membrana lipídica do que a condição de resveratrol livre, pois o tamanho das nanopartículas é muito importante para a aplicação farmacológica destas, como Sessa *et al.*, reportaram em estudo de permeação do RVTL, no qual as partículas menores apresentaram maior permeabilidade, segundo autores foram analisadas nanopartículas de 128 a 235 nm⁸⁰.

Contudo, para melhor complementar o trabalho seria interessante realizar pesquisas posteriores para estudar a melhor proporção entre os reagentes para adaptação desejada aos parâmetros de tamanho, potencial zeta e morfologia das partículas e melhorar o teor e a eficiência de encapsulamento bem como o potencial biológico destes compostos sozinhos e combinados. Para avaliar de maneira geral o efeito da concentração nas propriedades físico-químicas dessas nanopartículas.

Assim, apesar dos resultados da lipoperoxidação requererem mais estudos, este trabalho contribui para investigar a atividade fotoprotetora do RVTL, bem como para caracterizar estes sistemas de PCL encapsulando o resveratrol, a avobenzona e ambos.

6. Referências

1. Afaq, F., Adhami, V. M. & Ahmad, N. Prevention of short-term ultraviolet B radiation-mediated damages by resveratrol in SKH-1 hairless mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **186**, 28–37 (2003).
2. Velasco, M. V. R. *et al.* Broad spectrum bioactive sunscreens. *Int. J. Pharm.* **363**, 50–57 (2008).
3. Planta, M. B. Sunscreen and Melanoma: Is Our Prevention Message Correct? *J. Am. Board Fam. Med.* **24**, 735–739 (2011).
4. de Souza, S. R. P., Fischer, F. M. & de Souza, J. M. P. Bronzeamento e risco de melanoma cutâneo: Revisão da literatura. *Rev. Saude Publica* **38**, 588–598 (2004).
5. Araujo, T. & Souza, S. Protetores solares e os efeitos da radiação ultravioleta. *Sci. Plena* **4**, 1–7 (2008).
6. Schalka, S. & Addor, F. Protetores solares. *Rev. Bras. Med.* **65**, 6–11 (2008).
7. Verschooten, L., Declercq, L. & Garmyn, M. Adaptive response of the skin to UVB damage: Role of the p53 protein. *Int. J. Cosmet. Sci.* **28**, 1–7 (2006).
8. Chatelain, E. & Gabard, B. Photostabilization of butyl methoxydibenzoylmethane (Avobenzene) and ethylhexyl methoxycinnamate by bis-ethylhexyloxyphenol methoxyphenyl triazine (Tinosorb S), a new UV broadband filter. *Photochem. Photobiol.* **74**, 401–406 (2001).
9. Cantrell, A. & McGarvey, D. J. Photochemical studies of 4-tert-butyl-4'-methoxydibenzoylmethane (BM-DBM). *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **64**, 117–122 (2001).
10. Damiani, E., Rosati, L., Castagna, R., Carloni, P. & Greci, L. Changes in ultraviolet absorbance and hence in protective efficacy against lipid peroxidation of organic sunscreens after UVA irradiation. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **82**, 204–213 (2006).
11. Sayre, R. M., Dowdy, J. C., Gerwig, A. J., Shields, W. J. & Lloyd, R. V. Unexpected photolysis of the sunscreen octinoxate in the presence of the sunscreen avobenzene. *Photochem. Photobiol.* **81**, 452–456 (2005).
12. Pinnell, S. R. Cutaneous photodamage, oxidative stress, and topical antioxidant protection. *J. Am. Acad. Dermatol.* **48**, 1–19 (2003).
13. Chen, L., Hu, J. Y. & Wang, S. Q. The role of antioxidants in photoprotection: A critical review. *J. Am. Acad. Dermatol.* **67**, 1013–1024 (2012).
14. Saija, A. *et al.* Influence of different penetration enhancers on in vitro skin permeation and in vivo photoprotective effect of flavonoids. *Int. J. Pharm.* **175**, 85–94 (1998).
15. Marti-Mestres, G. *et al.* The 'in vitro' percutaneous penetration of three

- antioxidant compounds. *Int. J. Pharm.* **331**, 139–144 (2007).
16. Trela, B. & Waterhouse, A. Resveratrol: isomeric molar absorptivities and stability. *J. Agric. Food Chem.* **44**, 1253–1257 (1996).
 17. Tomé-Carneiro, J. *et al.* Resveratrol and clinical trials: the crossroad from in vitro studies to human evidence. *Curr. Pharm. Des.* **19**, 6064–93 (2013).
 18. Bhaumik, A. *et al.* The bioactive molecule resveratrol (RVTL) obtained from the black grapes (*Vitis vinefera*) act as potential hepatocytes regenerators and cytotoxic agent. *Der Pharma Chem.* **7**, 112–127 (2015).
 19. Info, P. & Info, G. Product Specification. 1–2
 20. Aggarwal, B. B. *et al.* Role of resveratrol in prevention and therapy of cancer: preclinical and clinical studies. *Anticancer Res* **24**, (2004).
 21. López-Nicolás, J. M. & García-Carmona, F. Aggregation state and pKa values of (E)-resveratrol as determined by fluorescence spectroscopy and UV-visible absorption. *J. Agric. Food Chem.* **56**, 7600–7605 (2008).
 22. Amri, A., Chaumeil, J. C., Sfar, S. & Charrueau, C. Administration of resveratrol: What formulation solutions to bioavailability limitations? *J. Control. Release* **158**, 182–193 (2012).
 23. Juan, M. E., Alfaras, I. & Planas, J. M. Colorectal cancer chemoprevention by trans-resveratrol. *Pharmacol. Res.* **65**, 584–591 (2012).
 24. Frémont, L. Biological effects of resveratrol. *Antioxid. Redox Signal.* **3**, 1041–1064 (2001).
 25. Jang, M. Cancer chemopreventive activity of resveatrol, a natural product derived from grapes. *Science (80-.).* **275**, 218–220 (1997).
 26. Machado Rocha Ribeiro, S. *et al.* A formacao e os efeitos das especies reativas de oxigenio no meio biologico. *Biosci. J.* **21**, 133–149 (2005).
 27. Mertins, O., Sebben, M., Schneider, P. H., Pohlmann, A. R. & Da Silveira, N. P. Caracterização da pureza de fosfatidilcolina da soja através de RMN de ¹H e de ³¹P. *Quim. Nova* **31**, 1856–1859 (2008).
 28. Frankel, N. Lipid oxidation. *Pro O. Lipid Res* **19**, 1–22 (1980).
 29. Kubow, S. Routes of formation and toxic consequences of lipid oxidation products in foods. *Free Radic. Biol. Med.* **12**, 63–81 (1992).
 30. Aitken, R. J. & Clarkson, J. S. Significance of reactive oxygen species and antioxidants in defining the efficacy of sperm preparation techniques. *J. Androl.* **9**, 367–376 (1988).
 31. White, R. D., Robson, R. E., Morrison, M. a, Li, B. & Ness, K. F. The $\nu = 0 \rightarrow 1$ vibrational cross-section for e–H ² scattering: An unresolved problem with wide implications. *J. Phys. Conf. Ser.* **71**, 12004 (2007).
 32. Del Rio, D., Stewart, A. J. & Pellegrini, N. A review of recent studies on

- malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* **15**, 316–328 (2005).
33. Gutteridge, J. M. C. The use of standards for malonyldialdehyde. *Anal. Biochem.* **69**, 518–526 (1975).
 34. Draper, H. H. & Hadley, M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* **186**, 421–431 (1990).
 35. Tadolini, B., Juliano, C., Piu, L., Franconi, F. & Cabrini, L. Resveratrol inhibition of lipid peroxidation. *Free Radic. Res.* **33**, 105–14 (2000).
 36. Martins, I. M., Barreiro, M. F., Coelho, M. & Rodrigues, A. E. Microencapsulation of essential oils with biodegradable polymeric carriers for cosmetic applications. *Chem. Eng. J.* **245**, 191–200 (2014).
 37. Letchford, K. & Burt, H. A review of the formation and classification of amphiphilic block copolymer nanoparticulate structures: micelles, nanospheres, nanocapsules and polymersomes. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **65**, 259–269 (2007).
 38. Singh, G. & Pai, R. S. Trans-resveratrol self-nano-emulsifying drug delivery system (SNEDDS) with enhanced bioavailability potential: optimization, pharmacokinetics and in situ single pass intestinal perfusion (SPIP) studies. *Drug Deliv.* **22**, 522–530 (2015).
 39. Kakran, M. & Antipina, M. N. Emulsion-based techniques for encapsulation in biomedicine, food and personal care. *Curr. Opin. Pharmacol.* **18**, 47–55 (2014).
 40. Breu, F., Guggenbichler, S. & Wollmann, J. Sistemas Nanoestruturados Lipídicos Contendo Resveratrol: Preparação, Caracterização E Avaliação Da Penetração Cutânea. *Vasa* (2008).
 41. Li, B.-G. & Zhang, L.-M. Synthesis and characterization of novel amphiphilic block copolymers based on maltoheptaose and poly(ϵ -caprolactone). *Carbohydr. Polym.* **74**, 390–395 (2008).
 42. Wei, X. *et al.* Biodegradable poly(ϵ -caprolactone)-poly(ethylene glycol) copolymers as drug delivery system. *Int. J. Pharm.* **381**, 1–18 (2009).
 43. Sinha, V. R., Bansal, K., Kaushik, R., Kumria, R. & Trehan, A. Poly- ϵ -caprolactone microspheres and nanospheres: An overview. *Int. J. Pharm.* **278**, 1–23 (2004).
 44. Rosado, C., Silva, C. & Reis, C. P. Hydrocortisone-loaded poly(ϵ -caprolactone) nanoparticles for atopic dermatitis treatment. *Pharm. Dev. Technol.* **18**, 710–8 (2012).
 45. Guterres, S. S., Alves, M. P. & Pohlmann, A. R. Polymeric nanoparticles, nanospheres and nanocapsules, for cutaneous applications. *Drug Target Insights* **2**, 147–157 (2007).
 46. Minatti, E. *et al.* Micellar morphological changes promoted by cyclization of PS-*b*-PI copolymer: DLS and AFM experiments. *Macromolecules* **36**, 4125–4133

(2003).

47. Soppimath, K. S., Aminabhavi, T. M., Kulkarni, A. R. & Rudzinski, W. E. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *J. Control. Release* **70**, 1–20 (2001).
48. Mora-Huertas, C. E., Fessi, H. & Elaissari, A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. *Int. J. Pharm.* **385**, 113–142 (2010).
49. Fessi, H., Puisieux, F., Devissaguet, J. P., Ammoury, N. & Benita, S. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *Int. J. Pharm.* **55**, 1–4 (1989).
50. Rocha, A. B. O. *et al.* *Quim. Nova*, **39**, 1112–1125 (2016).
51. Fayad, S. J., Ramos, B. G. Z., Minatti, E. & Soldi, V. NANOPARTÍCULAS OBTIDAS A PARTIR DA PROTEÍNA ISOLADA DE SOJA (SPI) PELO MÉTODO DE COACERVAÇÃO EM ÁGUA : EFEITO DA FORÇA IÔNICA E DAS CONCENTRAÇÕES DE PROTEÍNA E SURFACTANTE .
52. Hassellöv, M., Readman, J. W., Ranville, J. F. & Tiede, K. Nanoparticle analysis and characterization methodologies in environmental risk assessment of engineered nanoparticles. *Ecotoxicology* **17**, 344–361 (2008).
53. Hassan, P. A., Rana, S. & Verma, G. Making Sense of Brownian Motion: Colloid Characterization by Dynamic Light Scattering. (2015).
54. Hoo, C. M., Starostin, N., West, P. & Mecartney, M. L. A comparison of atomic force microscopy (AFM) and dynamic light scattering (DLS) methods to characterize nanoparticle size distributions. *J. Nanoparticle Res.* **10**, 89–96 (2008).
55. Goldberg, W. I. Dynamic light scattering. *Am. J. Phys.* **67**, 1152–1160 (1999).
56. Zanetti-Ramos, B. G. *et al.* Dynamic light scattering and atomic force microscopy techniques for size determination of polyurethane nanoparticles. *Mater. Sci. Eng. C* **29**, 638–640 (2009).
57. Kirby, B. J. & Hasselbrink, E. F. Zeta potential of microfluidic substrates: 1. Theory, experimental techniques, and effects on separations. *Electrophoresis* **25**, 187–202 (2004).
58. Schaffazick, S. R., Guterres, S. S., De Lucca Freitas, L. & Pohlmann, A. R. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. *Quim. Nova* **26**, 726–737 (2003).
59. MALVERN, I. Zetasizer nano series user manual. MAN0317, n. 11, 2005..pdf.
60. Nemen, D. & Senna, E. L. *Quim. Nova*, **33**, 48–51 (2010).
61. Provencher, S. W. CONTIN: A GENERAL PURPOSE CONSTRAINED REGULARIZATION PROGRAM FOR INVERTING NOISY LINEAR ALGEBRAIC AND INTEGRAL EQUATIONS. **27**, (1982).

62. Venditti, E. *et al.* In vitro photostability and photoprotection studies of a novel 'multi-active' UV-absorber. *Free Radic. Biol. Med.* **45**, 345–354 (2008).
63. Cosco, D. *et al.* Ultradeformable liposomes as multidrug carrier of resveratrol and 5-fluorouracil for their topical delivery. *Int. J. Pharm.* **489**, 1–10 (2015).
64. Caddeo, C. *et al.* Investigating the interactions of resveratrol with phospholipid vesicle bilayer and the skin: NMR studies and confocal imaging. *Int. J. Pharm.* **484**, 138–145 (2015).
65. Coradini, K. *et al.* Co-encapsulation of resveratrol and curcumin in lipid-core nanocapsules improves their in vitro antioxidant effects. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **88**, 178–185 (2014).
66. Govender, T., Stolnik, S., Garnett, M. C., Illum, L. & Davis, S. S. PLGA nanoparticles prepared by nanoprecipitation: Drug loading and release studies of a water soluble drug. *J. Control. Release* **57**, 171–185 (1999).
67. Pusey, P. N. *gels e.* **42**, 2161–2175 (1990).
68. HACKLEY, Vincent A.; FERRARIS, Chiara F. The use of nomenclature in dispersion science and technology . US Department of Commerce, Technology Administration, National Institute of Standards and Technology, 2001. 2001 (2001).
69. Zanetti-Ramos, B. G. *et al.* Dynamic light scattering and atomic force microscopy techniques for size determination of polyurethane nanoparticles. *Mater. Sci. Eng. C* **29**, 638–640 (2009).
70. Schaffazick, S. R. & Pohlmann, A. R. Caracteriza çã o e Estudo de Estabilidade de Suspens õ es de Nanoc á psulas e de Nanoesferas Polim é ricas Contendo Diclofenaco. *Acta Farm. Bonaer.* **21**, 99–106 (2002).
71. Gokce, E. H. *et al.* Resveratrol-loaded solid lipid nanoparticles versus nanostructured lipid carriers: Evaluation of antioxidant potential for dermal applications. *Int. J. Nanomedicine* **7**, 1841–1850 (2012).
72. Mitchnick, M. Particles Science. *Drug Dev. Serv. Tech. Br.* **1**, 2 (2009).
73. apostila de Práticas de Química Inorgânica realizada pela Universidade Federal de Viçosa 2010 Marcelo Ribeiro Leite de Oliveira José Roberto da Silveira Maia Per Christian Braathen. 2010 (2010).
74. Sanna, V. *et al.* Effect of chitosan concentration on PLGA microcapsules for controlled release and stability of resveratrol. *Int. J. Biol. Macromol.* **72**, 531–536 (2015).
75. Uchiyama, M. & Mihara, M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Anal. Biochem.* **86**, 271–278 (1978).
76. Wrolstad, R. E. *et al.* Ronald E. Wrolstad, Terry E. Acree, Eric A. Decker, Michael H. Penner, David S. Reid, Steven J. Schwartz, Charles F. Shoemaker, Denise M. Smith, Peter Sporns John Wiley & Sons, 2 de set de 2005 - 624 páginas. 2005 (2005).

77. Nair, V. & Turner, G. A. The thiobarbituric acid test for lipid peroxidation: Structure of the adduct with malondialdehyde. *Lipids* **19**, 804–805 (1984).
78. Pandel, R., Poljšak, B., Godic, A. & Dahmane, R. Skin Photoaging and the Role of Antioxidants in Its Prevention. *ISRN Dermatol.* **2013**, 1–11 (2013).
79. Coimbra, M. *et al.* Improving solubility and chemical stability of natural compounds for medicinal use by incorporation into liposomes. *Int. J. Pharm.* **416**, 433–442 (2011).
80. Sessa, M. *et al.* Bioavailability of encapsulated resveratrol into nanoemulsion-based delivery systems. *Food Chem.* **147**, 42–50 (2014).
81. Ignatowicz, E. & Baer-Dubowska, W. Resveratrol, a natural chemopreventive agent against degenerative diseases. *Pol. J. Pharmacol.* **53**, 557–569 (2001).